

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-532715

(P2002-532715A)

(43) 公表日 平成14年10月2日 (2002.10.2)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 33/483	F 2 G 0 4 5
33/483		33/50	P 4 B 0 2 4
33/50		37/00	1 0 1 4 B 0 2 9
37/00	1 0 1	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 6 3
// C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	Z
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全104頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-588596 (P2000-588596)  
 (86) (22) 出願日 平成11年12月9日 (1999.12.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成13年6月18日 (2001.6.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US99/29195  
 (87) 国際公開番号 WO00/36407  
 (87) 国際公開日 平成12年6月22日 (2000.6.22)  
 (31) 優先権主張番号 09/212,622  
 (32) 優先日 平成10年12月16日 (1998.12.16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 キュラゲン コーポレイション  
 アメリカ合衆国 コネチカット 06511,  
 ニュー ヘブン, ロング ワーフ ド  
 ライブ 555, 11 ティーエイチ フロア  
 -  
 (72) 発明者 ベイダー、ジョエル、エス.  
 アメリカ合衆国 06405 コネチカット州、  
 プランフォード、サウス メイン ストリ  
 ート 85、アパートメント 4イー  
 (74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

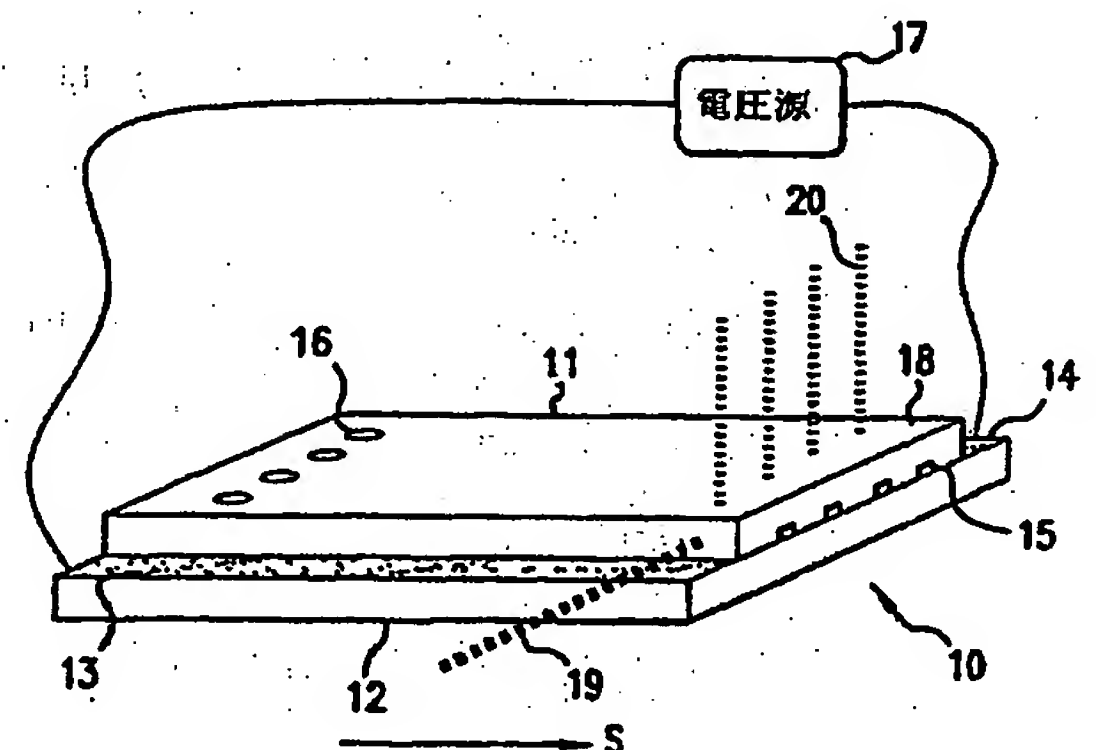
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 空間的且つ時間的に変動する電場による荷電粒子の分離

(57) 【要約】

【課題】 空間的且つ時間的に変動する電気ポテンシャルを用いて、粒子の拡散性に基づいて分離媒体中の粒子を分離するための装置を提供する。

【解決手段】 (ポテンシャルがフラットな) オフ状態と1以上のオン状態をサイクルする電気ポテンシャルに晒された荷電粒子の移動を利用するものであり、好ましくは、偏心状の複数個の静的ウェルを有するポテンシャルが空間的に周期的である。ポテンシャルウェルはオン状態では一定の空間位置にある。液体相の拡散性の違いにより荷電粒子の分離が起こる。物理的に定義された分離レーン (15) に分離媒体を満たす。実質的にレーンを横断するように設置された電極により必要なポテンシャルが得られる。注入ポート (16) により試料を装填することができ、また空間ゲーティング電極が分離前の試料をフォーカスする。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 それぞれウェルミニマムを有する複数個のポテンシャルウェルを含む空間的且つ時間的に変動する電気ポテンシャル中に、媒体中の荷電粒子を晒すことからなる、荷電媒体中の荷電粒子パケットをフォーカスする方法において、前記時間的な変動は、荷電粒子がポテンシャルウェルのウェルミニマムに誘引される“オン”状態、及び荷電粒子が媒体中に拡散する“オフ”状態を含む少なくとも2つの状態間での変動の繰り返しであることを特徴とする方法。

【請求項2】 (a) 媒体中の粒子をフォーカスし、及び(b) 該フォーカスされた媒体中の粒子を、それぞれウェルミニマムを有する複数個のポテンシャルウェルが移動方向に沿って分散配置された空間的且つ時間的に変動する電気ポテンシャル中に晒すことからなる、媒体中の荷電粒子パケットを移動方向に移動させる方法において、前記時間的な変動は、荷電粒子がポテンシャルウェルのウェルミニマムに誘引される“オン”状態、及び荷電粒子が媒体中に拡散する“オフ”状態を含む少なくとも2つの状態間での変動の繰り返しであることを特徴とする方法。

【請求項3】 (a) 媒体中の粒子をフォーカスし、(b) 該粒子を複数種類に分割し、及び(c) 各種類の粒子を再フォーカスすることからなる、分離媒体中の荷電粒子を分離方向に沿って分離する方法。

【請求項4】 前記粒子を数種類に分割するステップは、前記フォーカスされた媒体中の粒子を、分割が起こるような空間的且つ時間的な変動をする電気ポテンシャル中に晒すことからなり、前記空間的な変動は、分離方向に沿って配置されそれぞれウェルミニマムを有する複数個のポテンシャルウェルによるものであり、前記時間的な変動は荷電粒子がポテンシャルウェルのウェルミニマムに誘引される“オン”状態、及び荷電粒子が分離媒体中に拡散する“オフ”状態を含む少なくとも2つの状態間での変動の繰り返しであることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】 電気ポテンシャルの時間変化の周期は粒子分離中に変動することを特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記媒体中の粒子をフォーカスするステップは、前記媒体中の

粒子を、フォーカスが起こるような空間的且つ時間的変動をする電気ポテンシャル中に晒すことからなり、前記空間的変動は、分離方向に沿って配置されそれぞれウェルミニマムを有する複数個のポテンシャルウェルによるものであり、前記時間的変動は荷電粒子がポテンシャルウェルのウェルミニマムに誘引される“オン”状態、及び荷電粒子が分離媒体中に拡散する“オフ”状態を含む少なくとも2つの状態間での変動の繰り返しであることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項7】 前記ステップ(c)は、個別のパッド上で前記複数種類の粒子それぞれを再フォーカスすることにより行われることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項8】 (a) 粒子をフォーカスする手段と、(b) 分離媒体を受容可能な1以上の分離レーンと、及び(c) 前記1以上の分離レーン内に、時間とともに変動する静的空間パターンを有する電気ポテンシャルを発生できるような複数個の分離電極と、からなる荷電粒子を複数種類に分離するための装置。

【請求項9】 前記複数個の分離電極は第1の分離電極群及び第2の分離電極群からなり、前記分離電極群はそれぞれ実質的に周期的に同じ距離分隔離され、また前記分離電極の第1の分離電極群及び第2の分離電極群は互いにかみ合うように配置されていることを特徴とする請求項8に記載の装置。

【請求項10】 前記複数個の分離電極は、クロスワイヤ状にスイッチングが可能な電圧供給源に接続された少なくとも4個の結合パッドに接続されていることを特徴とする請求項9に記載の装置。

【請求項11】 前記複数個の分離電極は、前記装置の対角線に沿って直角を有することを特徴とする請求項10に記載の装置。

【請求項12】 複数個の再フォーカスセクションをさらに含む請求項9又は10のいずれかに記載の装置において、各再フォーカスセクションは1以上の再フォーカスギャップ及び複数個の再フォーカス電極からなり、前記1以上の再フォーカスギャップ内に、時間とともに変動する静的空間パターンを有する電気ポテンシャルを発生することができるようになっていることを特徴とする装置。

【請求項13】 前記再フォーカスセクションの数は実質的に前記種類の数に

相関することを特徴とする請求項12に記載の装置。

【請求項14】 前記複数の再フォーカス電極は前記装置の対角線に沿って直角を有することを特徴とする請求項12に記載の装置。

【請求項15】 前記分離電極は、前記分離電極と前記分離媒体との接触が最小になるように形成されていることを特徴とする請求項8に記載の装置。

【請求項16】 前記電極は白金からなり、チタン接着層によって基盤に結合されていることを特徴とする請求項8に記載の装置。

【請求項17】 前記分離レーンは第1ウェーハ及び第2ウェーハに包まれており、前記第1ウェーハは平面状の第1主表面及び第2主表面を有し、前記第2ウェーハは、前記第1ウェーハの第1主表面と同じ平面において平面状の第1主表面を有し、前記第1ウェーハの第2主表面と同じ平面において平面状の第2主表面を有し、前記第1ウェーハの前記第1主表面及び前記第2ウェーハの前記第1主表面は基盤に結合されており、前記第1ウェーハの前記第2主表面及び前記第2ウェーハの前記第2主表面は前記装置を覆うカバーに結合されていることを特徴とする請求項8に記載の装置。

【請求項18】 請求項8に記載の装置において、1以上の分離レーンに隣接した1個の電極は装置内に存在しないことを特徴とする装置。

【請求項19】 請求項8に記載の装置において、1以上の分離レーンに隣接した電極の全てが装置内に存在しないことを特徴とする装置。

【請求項20】 フォーカス媒体を収容することができる1又は複数のフォーカスギャップと、前記1又は複数のフォーカスギャップに電気ポテンシャルを発生させることができるような複数のフォーカス電極とからなり、前記電気ポテンシャルは時間とともに変動する静的空間パターンを有することを特徴とする、荷電粒子をフォーカスするための装置。

【請求項21】 前記複数のフォーカス電極はさらに、前記荷電粒子をセンターラインに沿って連続的に凝集させるように作られていることを特徴とする請求項20に記載の装置。

【請求項22】 前記複数のフォーカス電極はさらに、前記フォーカス電極と前記フォーカス媒体との接触を最小化するように作られていることを特徴とす



る請求項20に記載の装置。

【請求項23】 前記複数個のフォーカス電極は、第1の分離電極群及び第2の分離電極群からなり、前記分離電極群はそれぞれ実質的に周期的に同じ距離分離され、また前記分離電極の第1の分離電極群及び第2の分離電極群は互いにかみ合うように配置されていることを特徴とする請求項20に記載の装置。

【請求項24】 前記複数個のフォーカス電極は、それぞれ隣接する結合パッドと反対の電圧極性を有するように作られた少なくとも4個の結合パッドに接続されていることを特徴とする請求項23に記載の装置。

【請求項25】 前記複数個のフォーカス電極は、前記装置の対角線に沿って直角を有することを特徴とする請求項24に記載の装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本出願は、1996年3月27日出願の米国特許出願No. 08/623, 346の部分的継続であり、該特許出願の全てが参照として本明細書中に含まれている

本出願の開示には、一部、著作権で保護される資料が含まれている。著作権者は、本特許の明細書は特許商標庁のファイル及び記録に記載されているので、その特許明細書の複写複製に異論はないが、それ以外の場合にはいかなる場合であっても全ての著作権を留保するものである。

## 【0002】

本発明は、国立標準規格技術研究所(National Institute of Standards and Technology)によって審査された審査No. 70NANB5H1036に基づいて米国政府の支援によりなされたものである。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

## 【0003】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、媒体中の荷電粒子を、空間的且つ時間的に変動する電位の使用による媒体中の該粒子の拡散率の違いにしたがって分離するための方法及び装置に関する。特に、本発明は、液体媒体中の荷電生体高分子の分離のための方法及び装置に関するものであり、より特定的には、DNA配列決定及び一般的な断片長の測定用の1本鎖または2本鎖DNA断片の分離のための方法及び装置に関する。

## 【0004】

本発明はさらに、拡散性に基づいてDNAなどの荷電種を移動又は分離させる技術の有用性を高めるために、電極及び光学的設計パターンその他の装置構築手段を利用するための方法及び装置に関する。

## 【0005】

## 【従来の技術】

荷電粒子、特に、化学種の物理的混合物の分離は、重要な分析操作である。関連する化学種には、合成高分子のような非生体荷電種、及びDNA、RNAまたはタンパク質のような生体荷電種などがある(A. J. Kostichkaら, 1992, Bio/Technology 10:78)。DNA断片の混合物の分離は特に重要である。

## 【0006】

例えば、ヒトゲノムプロジェクトは、DNA断片の効果的な分離方法及び装置が必要であることを表明している。このプロジェクトは、ヒトの遺伝地図を改良し、2006年までにヒト及びいくつかのモデル生物のゲノム配列を完全に決定し、そして急増する情報を保存し、アクセスするためのコンピューターツールを開発するための大がかりな国際的作業である。このプロジェクトには、迅速で費用対効果に優れた手法で高品質の配列情報を供給することができる技術基盤が必要である。

## 【0007】

2006年までに約 $3 \times 10^9$ 塩基対を有するヒトゲノム配列を完全に決定するには、現在の世界中の全DNA配列決定能力のおおよそ100倍の能力が必要である(M. V. Olson, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4338)。現在のDNA配列決定方法、例えば、質量分析法(T. D. Woodら, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11451)、ハイブリダイゼーションによる配列決定法(R. Drmanacら, 1993, Science 260:1649)、クロマトグラフィー(C. G. Huberら, 1993, Nucl. Acids Res. 21:1061)、音波泳動法(acoustophoresis)(J. S. Heyman, 米国特許第5,192,450号)、及び電気泳動法は、この配列決定の目標を達成するには一般的に不十分である。

## 【0008】

上記の方法には種々の欠点がある。質量分析法には高価な質量分析計が必要である。かかる費用のために、この方法は広範な適用性を持つ見込みがない。ハイブリダイゼーションによる配列決定法は、まだ比較的新しく、試験されていない。液体クロマトグラフィーは、2本鎖DNA断片の迅速な分離を行うことはできるが、分解能が不十分なために制限される。配列決定に必要な1塩基分解能は、150塩基対よりも小さい断片においてのみ証明されている。音波泳動法においては、音波が液体媒体を通じて断片を押し動かす。この方法は、同様の長さのDNA断片では音響学的に同じ特性を有するため、効果的な分離が妨げられることによって制限される。

## 【0009】

電気泳動法は、DNA配列決定に対して最も一般的な方法である。通常の電気泳動法はどれもおおむね類似している(F. Sangerら, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463; L.M. Smith, 1993, Science 262:530)。まず、DNA試料を、通常、ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)によって増幅する(すなわちDNA鎖を複製する)。次に、増幅試料から、鎖終結DNAポリメラーゼ反応(これは、Sangerらによって最初に記載された)によって、4種の鎖終結塩基(ddATP、ddCTP、ddGTP、またはddTTPのどれか)の中の1つが結合した4種の特有の蛍光染料の中の1つで標識されたDNA断片のネステッド集合(nested sets)を産生させる。関連の方法においては、鎖を、化学的手段によって切断し、標識断片の同様の集合を産生させる(M. Maxamら, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560)。次いで、これらの断片を、種々の電気泳動技術によってそれらの分子のサイズにしたがって分離し、各鎖終結塩基を標識している特有の染料をその蛍光によって検出する。DNA塩基配列は、その検出された鎖断片パターンから再構築される。

#### 【0010】

DNA断片のサイズの測定に必要な精度は、その適用法に依存する。例えば、DNA配列決定反応は、個々の塩基によって分離された長さを有する断片の混合物(「ラダー」と呼ばれる)を産生し、正確な長さの測定を必要とする。その他の適用法は断片長間に大きな違いを生じさせ、迅速にサイズを決定する方法は、必ずしも長さの情報は正確ではないが、価値がある。そのような適用法の典型は、制限断片長多型(「RFLP」)のパターンの作製、遺伝子型分類、連鎖分析、マイクロサテライト(microsatellite)分析及びその他の断片分析方法である。

#### 【0011】

電気泳動分離において、DNA分子は電場中の移動速度にしたがって分離される。電気推進力は、分子の正味電荷に比例する。DNAのような一様に荷電した生体高分子については、推進力はDNA断片中の塩基対の数に比例する。液体のようなストークスの法則に従う物質中では摩擦係数も塩基対の数に比例するので、DNA断片は、断片長とほぼ同一で独立の電気泳動移動速度を有する。これは、DNA断片の電気泳動分離はストークスの法則に従う液体またはその他の媒体



においては難しいということを意味するものである。

#### 【0012】

したがって、電気泳動DNA分離には、一般的に、液体媒体の代わりに架橋ゲル及び非架橋ポリマー溶液が用いられる。これらの媒体中では、電気泳動移動速度は長さまたは分子量の増加とともに減少するので、DNAはストークスの法則に従わない。よって、生体高分子の電気泳動分離は、通常、アガロースまたはポリアクリルアミドのようなポリマーゲル中で行なわれるが、ここで、DNAまたはRNAのような同様の電荷密度を有する生体高分子の分離は、分子量に依存する。ゲル中では、断片サイズに対する摩擦係数はストークスの法則に依存しないことから、異なる長さのDNA断片の電気泳動分離が可能になる。したがって、生体高分子断片は、大きさが小さいものから大きいものの順に装置から出てゆく。

#### 【0013】

一般的な構成においては、電気泳動ゲルは、2枚の平らで平行な長方形のガラス板の間に薄いシートとして配置されている。電場は、その長方形配置の長軸に沿って生じ、分子移動が電場に平行ないくつかの経路または「レーン」中で同時に生じるように配列される。分離分解能を高めるために、移動レーン中のゲルは、可能な限り均一であり（または液体のように均一であり）、そしてレーンが明確に区別され得るように十分に分離されているのが都合がよい。

#### 【0014】

均一な移送特性を有する均一なゲルを作製する、または「注型する(cast)」ことは困難であることが判明している。主な問題の一つは、ゲル重合中、架橋によって生じる不均一なゲル収縮である。均一なゲルを注型することにおけるこの問題は、均一で再現性のあるローディング領域（ここに試料混合物を分離前にのせる）を作ることも困難にする。より再現性の良好な移送特性（すなわち、均一な液体のような移送特性）を有する分離媒体は有用性が大きいということは一般的に認識されている。

#### 【0015】

分離分解能を高めることに加えて、電気泳動をより迅速に行いたいという要求

によっても、ゲル操作に対してさらなる問題が引き起こされる。迅速で、高能力の生体高分子分析には、迅速な電気泳動が望ましい。これには、第一に、分子をより大きな速度で移動させるために、分子の移動においてより大きな力をはたらかせるより強力な電場が必要である。しかしながら、高電場、電圧及び速度によりゲル中の抵抗加熱が上昇してゲル中に有意な熱勾配が生じる。かかる熱勾配は、分離分解能をさらに損なうようなさらなるゲル不均一性を引き起こす。

#### 【0016】

高電圧で分解能を維持するために、有害な熱をより簡単に取り除くことが可能なように、より小さい形状寸法のゲルが用いられる。したがって、電気泳動は、典型的には1000  $\mu\text{m}$ よりも大きい通常のスペースの代わりに、平行したガラス板の間に25~150  $\mu\text{m}$ の間隔をあけた形状寸法で記載されている(A. J. Kostichkaら, 1992, Bio/Technology 10:78)。そのような薄さの均一ゲルを注型し、そのように薄いシート中に長く、平行で、狭く、かつ間隔の接近した移動レーンを確実に得るのはかなり困難であることが判明した。

#### 【0017】

また、薄いゲルにおけるこのような難点を克服するために、物理的分離手段がレーンの区別を維持するために用いられている。これらの分離手段によってさらに一連の問題が生じる。物理的に区別されたレーンを作るそのような方法の一つにおいては、100  $\mu\text{m}$ 未満の径を有する毛管を配列したものが用いられている(X. C. Huangら, 1992, Anal. Chem. 64:2149)。このような毛管を配列したものでは、均一なゲルの状態に注型するのが困難であり、断片試料をローディングするのが困難である。ローディングが簡単であるということは、分離のセットアップ（これは、大きな労働力を要することが多い）の時間及び費用を最小にするのに都合がよい。代案としては、各毛管にゲルの代わりに希薄なポリマー溶液を用いることがある(P. D. Grossman, 米国特許第5,374,527号)。しかしながら、そのような溶液における1塩基分解能は、200塩基未満のDNA鎖に限られており、毛管への試料のローディングは困難なままである(A. E. Barronら, 1993, J. Chromatogr. A 652:3; A. E. Barronら, 1994, Electrophoresis 15:597; 及びY. Kimら, 1994, Anal. Chem. 66:1168)。その他の代案としては、電気泳動装置中にチャンネ

ルをマイクロ製造(microfabrication)することによって物理的に区別されたレーンを作ることなどが挙げられる(D. J. Harrisonら, 1992, Anal. Chem. 64:1926及びD. J. Harrisonら, 1993, Science 261:895)。電極は、電気泳動場の正確な制御が行なわれるように配置され得る(G. T. A. Kovacsら, 1990, ヨーロッパ特許0 376 611 A3及びD. S. Soaneら, 米国特許第5,126,022号)。ゲル中を移動させる別の代案では、光マイクロリソグラフィーを用いることにより、DNAの電気泳動分離のために移動障害物を準二次元的に配列したものが製造された(W. D. Volkmuthら, 1992, Nature 358:600)。

#### 【0018】

レーンサイズが小さいということは多数の移動レーンにおける多数の試料の分離に望ましいが、同時に矛盾する物理的要求を生み出す。多数のレーンで移動している断片を同時に検出するには、全レーンを限られた口径の分光器によって同時に観察することができるように、移動レーンを空間的にコンパクトに配置する必要がある。しかしながら、分離前の移動レーンへの試料のローディングは、広く間隔がつけられたレーンの方がより簡単で迅速であるので、そのような移動レーンに物理的に近い必要がある。通常の平板技術は、まっすぐな平行したレーンのみを有しており、これらの異なる要求を受け入れることはできない。

#### 【0019】

従来のゲルに基づく電気泳動分離方法についてのそのような問題が、新規の分離方法を調査する動機となった。電氣的に分極可能であるが、荷電していない粒子の非電気泳動分離方法は、粒子の液体中の拡散率における違いに基づくものである。非常に大きい塩基サイズのDNA断片のみが、この方法によって分離するのに十分な分極性を有している(A. Ajdariら, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. US A 88:4468; J. Rousseletら, 1994, Nature 370:446; 及びJ. F. Chauwinら, 1994, Europhys. Lett. 27:421)。この方法では、空間において周期的であるが非対称の、分離の方向に実質的に垂直な電場であって、オンからオフに時間的に周期変動するものを使用する。この非対称の電場が生じると、この電場は公知の静電気学の法則にしたがって一連の空間的に周期的な誘引領域に分極可能な粒子を誘引し、トラップする。しかしながら、電位がなくなると、粒子は自由に拡散する

。より小さい粒子はより迅速に拡散するので、周期変動している電場によって分極可能な粒子がサイズ分離される。

#### 【0020】

分極に基づく装置は、ウイルスの大きさ程度の粒子を分離するのに適しており、染色体全体のような非常に大きい塩基サイズのDNA断片を分離することも可能であり得る(J. Rousseletら, 1994, Nature 370:446)。この粒子サイズの制限は、分離される粒子が、液体中に実際に生じ得る電場によって誘引されるのに十分な大きさの分極性を有するという要求によるものである。誘引力は、電場の二乗で変化するので、高電圧が必要である。配列決定反応またはRFLPによって通常生じるサイズである、塩基の長さが数百のDNA断片の分離は、実際には電場の強さ及び電圧に限界があるため、このようなまたはこれと類似の分極に基づく装置の能力範囲外である。

#### 【0021】

前述の全ての技術の問題は、多数の生体高分子試料の迅速な同時分析のための機械を、低コスト且つ最小限の人間の介在で作ることを妨げるものである。そのような機械は、例えば、生物学的研究、ヒトゲノムプロジェクト、バイオテクノロジー工業、及び臨床診断などの生物学の多くの分野において広く必要とされていると感じられる。

#### 【0022】

上記の参考文献の引用は、かかる参考文献が本発明の従来技術であることの認識を構成するものではない。

#### 【0023】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の方法及び装置の目的の1つは、従来技術の問題を克服した、都合がよく、効率のよい荷電粒子の分離を提供することである。分離される粒子は、正または負のいずれに荷電していてもよい。特に、分離される荷電粒子は、1本鎖または2本鎖DNAのような生体高分子断片であり得る。

#### 【0024】

本発明の方法及び装置の別の目的は、分離を、空間的且つ時間的に変動する電



位を用いて行なうことである。電位は、電位が比較的強い場合に荷電粒子をトラップする、複数の偏心形状のポテンシャルウェルを有する。分離は、電位がかなり弱い（またはオフの）場合、粒子が分離媒体における拡散率の違いに基づいてウェルからウェルに示差的に拡散するために生じる。粒子分離のラインに沿った全体的な電位差が存在しないことは都合がよい。

#### 【0025】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、拡散性に荷電粒子を移動又は分離させる発明の技術の有用性を高めるような、電極パターンの設計を提供する。これらの設計の中には、最初の分離の前に濃縮試料の初期パケットを有利に形成できるようにして、分離能を高めるものもある。また、電極と最小限の接触で分離チャンネル内に実質的に均質な表面材料を提供することにより、荷電粒子（DNAなど）と親和性の高い材料の選択を可能にするような設計もある。さらに他の設計では、分離後に広く分布した試料の再フォーカスを可能にすることにより、検出能を高めることができるようになっている。そのような設計の1つにおいて、荷電粒子は分離チャンネルのセンターラインに継続的に再フォーカスされる。

#### 【0026】

本発明の他の実施態様は、温度ランピング及び電圧ランピングである。ある実施形態では、装置の温度を操作中に変化させる。これは大幅に変動する拡散係数を有する粒子群を分離するのに有利である。他の実施形態では、装置のポテンシャルを操作中に変化させる。この実施形態では、異なる寸法のフラグメントによる電圧変動に対する異なる反応の結果として分離が起こるようになっている。

#### 【0027】

本発明の様々な側面を組み合わせることが可能である。分離媒体中で荷電粒子を分離する本発明の1つの方法は、まず粒子をフォーカスし、その後粒子を複数の種類に分割し、最後に各種類を再フォーカスするものである。本発明の実施形態には、空間的且つ時間的に変動する電場を用いて、個々の種類への分割、再フォーカス、又はこれらの任意の組み合わせを実現することが含まれる。上記の電極の設計によって、空間的且つ時間的に変動する電場を選択的に用いることがで

き、したがってこれらの異なる本発明の実施形態を実現することができる。

#### 【0028】

本発明の方法及び装置の利点は、荷電粒子が電位と相互作用することである。これは、容易に得られる電場に対しては、分極可能な粒子と均一でない電場との間の弱い相互作用よりも強い相互作用であり、電場の強さの二乗、電場の空間的不均一性、及び粒子の分極性に依存する。

#### 【0029】

本発明の方法及び装置の利点は、本発明の電位状態が、荷電粒子を分離媒体中のそれらの拡散率に基づいて単独で分離するということである。それによって、本発明は、通常の電気泳動では不可能な、液体中またはストークスの法則に従う媒体中においてDNA断片を分離することができる。さらに、液体拡散率はゲル拡散率よりも大きいので、より迅速なDNA分離が可能である。しかしながら、本発明の方法及び装置は、液体分離媒体に限定されるものではない。

#### 【0030】

本発明の方法及び装置の利点は、ゲルを基材とする媒体の代わりに液体媒体が用いられ得るということである。液体媒体を用いる場合、本発明の方法及び装置は、例えば、小さい形状寸法でのゲルローディングの困難さ、収縮によるゲル不均質性、電気的内浸透、及び不均質ゲル注型などの、ゲルを基材とする媒体についての制限の多くから解放される。液体分離媒体は実質的に均一であるので、より再現性が良好な分離が可能であり、分離媒体における不均質性が最小化される。さらに、装置はすばやく再使用できる。試料は、均一な高電圧を印加することによって除去され得る。また、液体分離媒体を迅速に流し出し、次いで装置を洗浄溶液で洗浄し、新たな液体媒体を再ローディングする。

#### 【0031】

本発明の装置は、マイクロ製造に適した小規模のものであり得るという利点がある。小規模の結果、高処理量になる。小規模の結果、効率のよい熱伝達が得られ、局所加熱による分離媒体不均質性が低減される。さらに、装置が小さくなればなるほど、分離がより迅速になる。その上、装置は、低コストマイクロ製造に適している。多数のレーンは、1平方センチメートルの1個の基質上で作ること

ができる。本発明による分離モジュールは、試料調製及び断片検出装置と一体化することができる。ローディングゾーンは、ローディング電位を発生する電極を含む分離モジュール上に、分離前にローディングした試料を小容量に局在化させるために製造され得る。

#### 【0032】

本発明の方法及び装置の利点は、操作パラメータを分離される分子のサイズ及び要求される分離分解能に合わせることができるということである。したがって、全ての分子が短いか、または近似のサイズ（精度5～10%）のみが要求される場合には、より迅速な分離が得られ得る。

#### 【0033】

本発明の方法及び装置の利点は、表1に挙げたような通常の電気泳動システムに対する優位性を有するということである。

#### 【表1】

比較	本発明	従来の電気泳動
材料	組み立ておよび操作に費用がかからない； 比較的無毒性の分離媒体（水性緩衝液または変性有機物のいずれかを使用することが可能である）	操作に費用がかかる； 分離媒体としては一般的に有害なポリマー及び重合剤が使用される
セットアップ	ローディングが容易： 分離媒体は液体であり得る	ローディングが困難： ゲルの混合、注入、および重合が必要である
ローディング	ローディングゾーン電極による集中によって初期試料分布が狭くなる	ローディング領域における拡散によって初期試料分布が広幅になり、広幅バンドが得られる
速度	0.3 $\mu$ m の特徴的サイズ（マイクロ製造技術の現在の限界）について250塩基／時間／レーン	市販の装置で100～200塩基／時間
分解能	バンドは、均質な分離媒体および物理的にエッチングした移動レーンにより再現性がある	バンドは、ゲル分離媒体の不均質性およびゲルスラブ中の分離レーンが曲がることにより再現性に欠ける
複合性	1 cm 四方のチップに100レーンが容易に適合する	小さい形状寸法内に多数のレーンを分離するのは困難である
安全性	低電圧操作	高電圧操作
掃除	装置を新しい分離媒体で洗い流して再使用するのが容易	毒性ゲルの廃棄および支持プレートの洗浄が必要

## 【0034】

これらの目的及び利点は、空間的及び時間的に変化し得る電位の使用により、分離媒体中の粒子の拡散率の差異にしたがって、分離媒体中の荷電粒子、特に荷電化学種を分離することからなる、発明によって達成される。電位の空間的变化は、分離ラインに沿って、荷電粒子を誘引してトラップする複数のポテンシャルウェルを形成する。このポテンシャルウェルは、電位の最小点がウェルの中心か



らはずれて位置している、偏心型である。1 態様において、ウェルは一方の側が一般的に他方よりも急勾配であり、全体的には鋸歯型である。ポテンシャルウェルは各種の空間配置を取ることができるが、分離ラインに沿って周期的な配置が好ましい。時間的には、電位は2以上の状態間を循環するが、2つの状態の場合が好ましい。少なくとも状態の1つ、「オンー状態」において、粒子がポテンシャルウェル中で誘引されてトラップされる。少なくとももう一方の状態、「オフー状態」において、粒子は分離媒体中でその拡散率にしたがって実質的に自由に拡散する。好ましい態様において、オンー状態は各粒子がいずれかのポテンシャルウェルに局在化するのに十分な持続時間を有し、オフー状態の持続時間は可能な限り最も迅速な分離が得られるように最適化される。これによって、電位が時間的狀態間で循環するにつれて、粒子は拡散率にしたがって予測される様相で、ポテンシャルウェルからポテンシャルウェルに拡散し、これによって、それらの拡散率にしたがって分離される。

#### 【0035】

本方法の重要な適用例において、粒子は荷電生体高分子である。特に、液体などの媒体中のDNAの分離は、例えば、DNA配列決定、ならびに制限断片長多型（“RFLP”）の観察、遺伝子型の分類、連鎖解析、マイクロサテライト分析及びその他のDNA分析の適用において、重要である。一本鎖及び二本鎖DNA分子は実質的にそれらの断片の長さのみに依存する液相拡散率を有する荷電物質であるので、本方法をDNAの分離に適用することができる。

#### 【0036】

本発明の方法及び装置は、分離ラインに沿って隣接する最大点に関して偏心的に設置された複数のポテンシャルウェルを形成する空間的变化を有し、かつウェル中に荷電粒子をトラップする1以上の状態と媒体（好ましくは液体媒体）中で実質的に自由な拡散を許す1以上の状態との間の時間的变化を有する広範囲に変化する電場によって、効果的になる。ポテンシャルウェルは急勾配側と緩勾配側を有してもよいし、トラップ粒子をしっかりと閉じこめるための狭い最小点を持つ偏心型にしてもよいし、または一般的な非対称及び偏心型でもよい。ポテンシャルウェルは分離ラインに沿って周期的にまたは距離を変化させて設置すること

ができる。好ましい電位は分離ラインに沿った鋸歯型である。時間的には、電位は3以上の状態間を変化させるかまたは連続的に変化させてもよい。時間的变化は分離期間中一定にしてもよいし、分離期間中変化してもよい。好ましい電位はオン-状態とオフ-状態間のみで変化する。

#### 【0037】

以下の開示で明らかになるように、電位の空間的及び時間的变化を確定するパラメータは、装置がどんな物理的サイズでもよいように、分離すべき粒子の拡散率及び電荷の観点から選択することができる。しかし、好ましい態様において、特にDNA断片の分離のためには、可能な限り最も速い分離を達成するように構築される。こうした態様の1つにおいて、器具は利用可能なマイクロ製造(micro fabrication)技術を使用して構築することができるほどの小さいものである。

#### 【0038】

分離装置の1態様は分離媒体を保持するための1以上の連絡していない分離レーンを含むモジュールを有し、これに沿ってDNA断片が分離される。このモジュールはセンチメートル(“cm”)スケールの2つの基体で構築される。1つの基体は平板で、他方は、例えば溝を掘るか壁を設置するかによって製造されたチャンネルを有する。この2つの基体を1つに合わせると、これによって分離レーンが形成される。

#### 【0039】

分離レーンの配置を変えることも可能である。1つの配置は平行直線状レーンである。好ましい配置の1つは、ローディングのためにレーンへの物理的接近が容易になるように、モジュールのローディング部ではレーン間隔を広くとるが、末端検出部では、分離された断片を全分離レーンにおいて同時に検出することができるように、間隔を狭くするものである。チャンネルサイズは1mm未満、500 $\mu$ m、または100 $\mu$ mとすることができ、25 $\mu$ m程度に小さくすることもできる。

#### 【0040】

分離モジュールの好ましい態様において、平板状(溝がない方)の基体に設置された電極によって、空間的及び時間的に変化する電位が形成される。好ましい

態様において、電極は上記のチャンネルに対して実質的に直交方向に置かれ、空間的に周期的なポテンシャルウェルを形成するように配置され、この各ウェルは一般的に偏心「鋸歯」型をしている。この好ましい態様において、「オン」タイム、 $t_{on}$  については電極に電圧差が加えられ、「オフ」タイム、 $t_{off}$  については電極は同一の電位とする。電位差及び「オン」タイムはポテンシャルウェル中に荷電断片が局在化してトラップされるために十分であるように選定される。「オフ」タイムは断片が次のポテンシャルウェルへの拡散について有限の確率を有するように、選定される。電位に周期を与える結果、荷電断片は拡散率の差異に基づいて分離される。詳細な説明（第5節）によって、各種の操作パラメータの選定の方法が明らかにされる。

#### 【0041】

分離媒体はいくつかの基準に適合するように選定される。第1に、分離すべき粒子がその媒体中で荷電し、そして好ましくは広い範囲の拡散率を有することである。第2に、媒体が高電気破壊電位勾配を有し、しかも容易には電気分解されないことである。好ましくは、分離媒体は液体である。DNAを分離するのに適切なこうした媒体の例として、水性液体媒体、水性緩衝液、及びホルムアミドなどの非水性変性用液体媒体が含まれる。本発明は液体分離媒体に限定されるものではない。適切な電気特性を有し、その中で分離すべき粒子が荷電して異なる拡散率を有するような、各種濃度の各種のゲルまたはポリマーなどの媒体はいずれも使用することができる。

#### 【0042】

本発明によって、基本的な分離モジュールにおいて、各種の強化及び変更が意図される。1態様において、液体分離媒体及び分離するサンプルを、例えば分離モジュールの基体板の一方にドリルで開けた穴であるローディング口からローディングすることができる。こうしたローディング口を収容するため、それらの近傍で分離レーンの間隔をより広くする必要があるかもしれない。その他、装置の1態様として、分離の前に、ローディング口の中にローディングするサンプルを局在化及びトラップして、コンパクトな初期容量にするような、別のゲーティング (gating) を形成する、特別の電極が含まれる。

## 【0043】

装置中での温度及び温度勾配の制御が望ましく、これは好ましくは基体の一方または両方とうまく熱接触させた温度制御モジュールによって達成される。好ましい小サイズの装置では特に良好な熱制御が得られる。なぜならば、小さい分離媒体チャンネルは必然的に両方の基板を含む全側面で良好な熱接触となるからである。装置の1態様において、温度制御モジュールとして、分離モジュールと、例えば空気または水の交換流体と熱を交換する熱シンクとの間でいずれかの方向に熱を送るように配置した、Peltier 熱電モジュールなどの、2方向熱転移器具が含まれる。

## 【0044】

好ましい態様において、分離された粒子の観測は光学的方法によって実施される。こうした光学的観測方法の中の可能な1つとして、分離レーンに直交するレーザーまたはその他の励起によって蛍光シグナルを発生する、独特の蛍光タグで粒子を標識し、そのタグ蛍光を標準的な分光分析で検出するものが含まれる。多数の分離レーンから同時に蛍光を検出するためには、透過型イメージング分光器を使用するのが有利である。本発明は、DNA配列分析に特に適合する。この場合、各DNA分子は4つの鎖終結ddNTPの1つとに統合させた4種の光学的に識別し得る蛍光染料の1つで別々に標識される。分離すべき粒子が多種の染料で標識される応用例に対しても同様に適用することができる。

## 【0045】

関連する分野の当業者によってこの装置になされる多数の改変は、本発明によって意図されるものである。これらの改変の一部として以下のものが含まれる。拡散率を強化するために、媒体の温度を変化させることができる。ポリマー溶液またはゲルなどの分離用媒体もまた使用することができる。この装置の分離モジュールの基体、ならびに絶縁体、導電体及び抵抗器などの電気部品として、種々の材料を使用することができる。ポテンシャルウェルを形成させる機能を有する電位を得るために、様々な電極形状を使用することもできる。例えば、電極を分離レーンの底部に接触する層状に配置することもできる。これらは分離レーンの厚さを超えるほど厚いものでもよく、または中間の厚さでもよい。あるいは、分



離レーンの外側の電極によってポテンシャルウェルを形成することができる。各種のレーン形状が可能であり、これらとして、直線、部分的直線、開曲線、または閉曲線状の形状が含まれる。円形の配置では、レーンは円柱の周囲をとりかこんでいる。

#### 【0046】

本発明の方法及び装置は多くの分野での用途を有する。生物学の研究室ではゲノムの配列決定のための高処理量で複雑なDNA分析のための容易に使用できるシステムが必要とされている。医学の研究室でも、迅速で低コストのDNA分析及び配列決定の必要度が高まっている。例えばRNA及び蛋白質などのその他の荷電粒子の分離も研究室及び診断実験室で同様の用途を有する。

#### 【0047】

##### 【発明の実施の形態】

添付した図面、詳細な説明及び特許請求の範囲を参考にして、本発明のこれら及びその他の目的、特徴及び利点が当業者にとって明らかになるであろう。

#### 【0048】

##### 5. 発明の詳細な説明

第5. 1節に、本発明にしたがった代表的な分離器具の構造を説明する。第5. 2節に、分離方法及び器具の操作を要約して記載する。第5. 3節に、分離方法及び器具の操作をより詳細に記載し、そして方法の操作条件及び器具設計のパラメータの選択のための方法を提供する。第5. 4節に、DNAの分離の重要な事例を記載する。最後に、第5. 5節に、本発明にしたがった分離器具のマイクロ製造の代表的な方法を記載する。

#### 【0049】

##### 5. 1. 分離器具の説明

図1は本発明にしたがった分離器具を図示している。この分離器具及びその特定の具体例である、器具I型及びII型は器具として好ましい物理構造である。しかし、本発明の方法にしたがった荷電粒子の分離は、分離媒体を保持し、本発明の方法にしたがって電位を与えられる1以上の分離レーンを有する、別の任意の物理構造においても実施することができる。例えば、外部から電位を加えられる

おそらくは毛細管サイズの1以上のチューブ中で実施することができる。あるいは、分離媒体をスラブとして配置し、分離レーンをそのスラブ中に走らせた一般的な配置で、本発明を実施することができる。

#### 【0050】

図1において、分離器具10は2枚の基体、上部基体11及び下部基体12を含み、これらによって、これらの間にレーン15などの1以上の分離レーンが画定される。レーン15は、例えば上部基体11に開けられた穴からなるローディング口16から一般的に18において表示される観測ゾーンまで伸びている。荷電粒子が蛍光標識されている場合は、観測はレーザービーム19による観測ゾーン18の照射によって簡便に行うことができる。分離レーン中の粒子に誘発された蛍光20は分光分析器によって観測される。CCD検出器を使用する標準的オプティクスでは、同一面上の照射面  $100\mu\text{m}$  中  $0.01$  フェムトモル (“fm”) の蛍光染料標識粒子を検出することができる。例えば、J. W. Simpson ら、「生体高分子断片の産生、分離、検出及び認識のための装置及び方法」、米国特許出願番号 No. 08/438, 231、1995年5月9日出願、を参照されたい。この全文をここに参考として引用する。

#### 【0051】

本発明の1方法にしたがう電位は、基体の一方または両方に設置または貼り付けられた、以下に記載する、あるパターンの電極によって、チャンネル15に沿って発生される。各電極は電極パッド13または14の一方に接続され、このパッドを通じて外部電圧源17から誘導される、時間によって変化する電圧によってエネルギーが与えられる。

#### 【0052】

本方法の操作パラメータを選択することによって、器具をどんなサイズにも構築することができる。荷電粒子をより速く分離するためには、選択した製造またはマイクロ製造技術の制約の範囲内で、できるだけ器具を小さく製造することが好ましい。小さなサイズであれば1つの基体上に一連のチャンネルを置き、それによって同時に多数の分離を達成することも可能になる。しかし、器具は、分離すべき荷電粒子が分離中に互いに独立して移動すると同時に、少なくとも数百の

粒子が器具中を共に移送されるのに十分なほどの大きさにすべきである。荷電粒子が荷電分子の場合、この後者の条件は器具中の最小の寸法を分子の寸法の50から500倍の大きさに製造することによって、容易に満たすことができる。

#### 【0053】

基体、(II型器具における)チャンネル壁及び電極については多くの材料を使用することができる。1つの制限は、分離レーンに露出するどの材料も、使用する媒体及び分離すべき荷電粒子などのレーンの内容物に対して実質的に不活性でなければならない点である。材料が本来不活性であるか、または不動態化層、例えば電極の上側に配置された酸化珪素層によって保護されていなければならない。さらに、分離された粒子の検出を容易にするため、基体が蛍光標識の使用を可能にするものであるのが好ましい。こうして、基体は励起及び誘発された蛍光波長の光に対して実質的に透過性であるべきである。非晶質酸化珪素は、標識DNA断片に通常使用されるような大部分の蛍光染料に対して許容される基体の1例である。許容される材料のその他の例を第5.5節に記載する。

#### 【0054】

分離すべき荷電粒子はあらゆるサイズの個別の分子から任意の数及び種類の分子の複合体まで、及び巨視的サイズの粒子までの範囲とすることができる。

#### 【0055】

分離レーンは好ましくはいくつかの特性を示す分離媒体で充填される。第1の特性は、分離すべき粒子を溶解してイオン化することである。第2の特性は、分離すべき荷電粒子の型がその媒体中で異なる拡散率を有することである。全体として拡散率が高いほど、そして拡散率の差異が高いほど、媒体としてより好ましい。迅速な分離のための第3の特性は、媒体が高電位勾配に耐えることである。したがって、印加電位において媒体は好ましくは電気分解に抵抗性であることであり、そして分解電場が高いほど好ましい。最後に、媒体が小さい誘電率及び小さいイオン強度であるのが好ましい。なぜならば、電場の強度は媒体による誘電遮蔽及び含有イオンによるイオン遮蔽によって減少するからである。この後者の特性は、もちろん、荷電分子の溶媒和の必要性による制限を受ける。すなわち、対イオンが存在するために、一般的には高誘電溶媒及び限定されたイオン強

度を必要とするからである。

#### 【0056】

分離すべき特定の型の荷電粒子に関してこれらの条件に適合する分離媒体は実験によって最も簡単に決定することができる。DNAなどの生体高分子を分離するためには、好適な分離媒体は通常の電気泳動において普通に使用される水性溶媒または水性緩衝液である。あるいは、媒体はホルムアミドのような変性溶媒でもよい。荷電状態で分子を溶媒和することができ、そして十分な電位勾配が可能な、例えばDMSO（ジメチルスルホキシド）またはアルコール溶液などの、その他の有機溶媒もまた使用可能である。さらに、希薄ゲルまたはポリマー溶液も可能な分離媒体である。

#### 【0057】

分離器具は構成材料及び使用する分離媒体に適合するどの温度でも操作することができる。ここにあげるすべての実施例及び計算は特に明記しないかぎり周囲温度がおよそ  $298^{\circ}\text{K}$  での操作を仮定している。操作温度にかかわらず、分離媒体を各分離レーン間で均一に保持するするため、熱勾配を最小にすることが重要である。これは、分離器具の上部または底部基体、あるいはその両方を適宜熱シンクまたは熱源と熱接触するように設置することによって達成される。

#### 【0058】

I型及びII型と称する、図1に示す分離器具の特定の2つの具体例を以下の分節でさらに説明する。I型器具においては、チャンネル15のような分離レーンを形成するチャンネルを基体11または12の一方の面にエッチングする。II型器具においては、基体の一方の上に平行なチャンネル壁を配置することによって分離チャンネルを形成する。どちらの具体例においても、電極は基体の一方に配置される。

#### 【0059】

##### 5. 1. 1. I型器具

図2はI型器具の代表的な具体例の分解図である。器具10は上部基体11及び底部基体12を含んでいる。1以上の分離チャンネル15は、例えばエッチングまたはマイクロ機械加工によって上部基体11中に製造される。分離はチャン



ネルに沿って起こり、したがって、このチャンネルによって分離方向Sが確定される。1つのチャンネルの形状は好ましくは幅が約  $50\text{ }\mu\text{m}$  及び高さが  $10\text{ }\mu\text{m}$  のほぼ半円から矩形である。より小さい高さ及び幅のものが好ましい。なぜならば、分析のためにより少量のサンプルが必要とされるからである。幅は、従来からのゲルを基礎とする電気泳動器具の幅に匹敵するほどの大きなサイズまでの範囲でもよい。高さは、発生した電位でオンー状態中に十分粒子を局在化させられるように、十分小さいものが好ましい。このオンー状態は、分離すべき粒子を代表する粒子を使用した、与えられた器具の形状についての実験によって、最も簡単に決定される。各チャンネルは実質的に基体の全長まで伸びており、これは典型的には  $1\sim 10\text{ cm}$  であるが、第5.3節及び5.4節の設計方法にしたがって選定される。チャンネル間はできるだけ接近させ、好ましくはその幅とほぼ同程度の距離とする。上部板11には、以下にさらに記載するように、図1のローディング口16の穴を製造することができる。この注入口の直径は分離すべき粒子をレーン内にローディングすることができるように選択される。チャンネルは実質的に平行でもよいが、あるいはローディング口近辺での広い間隔から観測ゾーンでの狭い間隔へと収束させてもよい。2枚の基体を接合することによって、上部板に製造したチャンネルを密閉し、閉鎖された粒子分離レーンを形成させる。外部電圧源17と電気接続をするため、電極パッドが露出されるように、上部基体は底部基体に対して凹みを有する。

#### 【0060】

互いに対面し、互いに噛み合った2つの複数電極であって、複数の電極の組のそれぞれが2つの電極パッド13及び14の一方に接続されている電極を底部基体12の平面状の上面に設置する。あるいは、電極を上部基体11の平面状でない面に設置することができる。電極20及び22はパッド13に接続された複数の電極の代表例であり、電極21及び23はパッド14に接続された複数の電極の代表例である。これらの電極は好ましくは分離軸Sに対して実質的に直交する方向に伸びている。あまり好ましくはないが、収束する分離レーンの配置で生ずるように、電極が分離軸及び分離レーンに対して傾いているものもある。傾斜の角度が大きいほど、効果は小さくなり、そして粒子の分離能が悪くなる。これら



の各電極の厚さは、好ましくは約 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{m}$ よりも小さく、あまり好ましくはないが $1 \mu\text{m}$ よりも小さいものでもよい。ただし、大きなサイズのものが必ずしも器具の操作を妨害するわけではない。これらの各電極の幅は、その主要サイズを $R'$ で示すが、好ましくは約 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ よりも小さい。これよりも大きい値の $R'$ が器具の操作を妨害するわけではないが、 $R'$ のスケールで操作時間がより好ましくない結果になる。主要サイズが約 $1 \mu\text{m}$ のものは標準的なマイクロ製造技術で容易に達成することが可能である。好ましくは、電極パッド13及び14に接続された複数の電極のそれぞれが均一な距離 $L$ において周期的に配置される。例えば、電極20及び22は距離 $L$ だけ離れており、電極21及び23も同様である。好ましくは、複数の電極のそれぞれが互いに間隔 $R$ になるように配置される。例えば、電極20及び21の中心は距離 $R$ だけ離れており、電極22及び23の中心も同様である。好ましくは、 $R$ は $R'$ とほぼ等しく、一方 $L$ は $R/L$ が約 $0.1$ よりも小さくなるように選定される。しかし、 $0.5$ までの比率のものも使用することができる。選択した製造技術において達成し得る主要サイズ $R'$ に関して、最適な $R$ 、 $L$ 及び $R/L$ を選定する方法を、第6.2節に記載する。あるいは、第5.2及び5.3節に記載したモデルにしたがって、ある種の様相の粒子分離を最適化するため、 $R$ 、 $L$ または $R/L$ を分離軸に沿って規則的に変化させることができる。

#### 【0061】

図3は、器具10の分離方向 $S$ に対して直交する軸3-3に沿った断面図を示している。上部基体11及び底部基体12は、チャンネル15などの3つのチャンネルを形成し、これらは密閉されて分離レーンを形成している。代表的な電極20は、必要ならば好ましくは不動態化層で被覆されて、チャンネルの底部に沿って伸びている。

#### 【0062】

図4Aは2つの複数電極をより詳細に図式的に示している。一方の複数電極の電極20及び22は電極パッド13に接続され、他方の複数電極の電極21及び23はパッド14に接続されている。1つの複数電極内の電極は距離 $L$ だけ離れている。複数電極の間で互に隣接する電極の中心は距離 $R$ だけ離れている。各電

極の幅は $R'$ である。したがって、電極21と22の隣接する端部間の距離は $L - 2R - R'$ であり、電極20及び21（または22及び23）の隣接する端部間の距離は $R - R'$ である。パッド13及び14はそれぞれ電位 $-V_0/2$ 及び $+V_0/2$ に荷電される。 $V_0 > 0$ の場合、陽性荷電粒子の分離方向はSである。 $V_0 < 0$ の場合、Sは陰性荷電粒子の分離方向である。

#### 【0063】

図4Bは、分離レーンに沿って観測した、2つの複数電極によって発生される電位の大略を理念的に図示している。電位は、パッド13に接続された電極の近傍の最小値 $-V_0/2$ からパッド14に接続された電極の近傍の最大値 $+V_0/2$ まで変化する、一連のポテンシャルウェルを形成している。この電位は一般的に鋸歯形で、空間的に周期的であり、ポテンシャルウェルの各周期は均一かつ偏心的に位置した最小値を有する。各周期は、距離Rで分離された位置36及び37間の比較的短くてより急激に上昇する部分32と、距離Lで分離された位置R35及び36間の比較的長くてより緩やかに下降する部分を有している。分離方向、矢印Sは1つの最小点から最も近い隣接する最大点へ方向である。すなわち、矢印Sは最小点36から最も近い隣接する最大点37へ方向である。ポテンシャルウェルはこれらの方向においてすべてのウェルについて均一であり、すべてが同一の方向、ここでは矢印S、に並んでいる。さらに、電極形成部の近傍の空間でも、このポテンシャルウェルは不動のままであることは明らかである。パッドが反対の電位に荷電された場合は、上昇及び下降部分が交替する。

#### 【0064】

各ポテンシャルウェルに関する最小サイズは、分離すべき粒子を数百以上含有する、好ましい様相によって、一般的に制限を受ける。また、ウェルは含有される粒子が何ら相関関係なく独立して動くことができるほど大きくなければならない。荷電生体高分子が分離される、好ましい適用例において、Rが約 $0.1\mu\text{m}$ よりも大きければ、これは満たされる。

#### 【0065】

図5は、レーン15などの分離レーン中の分離方向である、図2の軸4-4に沿った器具10の断面図を示している。分離レーンは上部基体11で上部の、そ

して底部基体12で下部の境界が区切られ、これらの基体はHの距離があり、これがレーンの高さになっている。レーンの高さは好ましくは $10\mu\text{m}$ に選定されるが、電位がオン状態で粒子を局在化させるのに十分強いことという制限はあるものの、より大きな高さも可能である。一般的に底部プレート12上の20, 21, 22及び23にある電極は分離方向Sに対して実質的に直交し、分離レーンに露出して電位を発生する。これらの電極は好ましくは約 $0.1-0.2\mu\text{m}$ より小さい高さd、好ましくは $1-2\mu\text{m}$ の幅 $R'$ であり、そして間隔Rは好ましくは約 $2R'$ であるが、より小さな間隔の方が、迅速な分離ができることになるのでより好ましい。電極は好ましくは $R/L$ が0.1以下になるように選定した一定の距離Lで周期的に配置されるのが好ましい。あるいは、あまり好ましくはないが、 $R/L$ を0.3未満とする。効果は劣るが、限界比率0.5（すなわち、対称的なウェル）でも、器具は機能し続ける。

#### 【0066】

分離の前の粒子のローディングを容易にするため、器具にローディング部を設置するのが有利である。現行のローディング技術でローディングするのを容易にするため、ローディング部は好ましくはマイクロピペットのサイズである、 $50-100\mu\text{m}$ 程度の直径を有する。したがって、分離レーンの幅及び間隔によって、これが好都合な尺度となる。あるいは、好ましいサイズのローディング口を可能にするため、もっと狭い分離レーンにしてローディング部で広い間隔をとらせることができ、そして観測ゾーンで間隔を狭くするように収束させることができる。最適な分離能及び速度を達成するため、分離前に全粒子が1つのポテンシャルウェルの中に引き込まれ、一連のポテンシャルウェル間の間隔は前記のようにするのが好ましい。

#### 【0067】

図1のローディング口16についての器具10の拡大及び分解図である図6はこれらの特性を満たすように適合させたローディング部を示している。分離すべき粒子を器具の外部から部位51においてピペット51、または同様な機序で分離レーン15の内部の部位52に導入する。ローディング口16の下の方電極54及び55はローディング口16の直径の程度まで大きな間隔をとらせている。粒

子のローディング中またはローディング後、電極パッド、したがって電極54及び55に、全粒子を電極55のごく近傍、部位53に引き付けるのに十分な時間、電位を与える。十分な時間は、第5.3節に記載した $t_0$ の決定と同様の方法で評価することができる。粒子を引き付けてトラップした後、粒子の分離を開始することができる。分離すべき粒子の初期分布をより小さくするため、ローディング領域に別の電極配置を使用することもできる。例えば、分離開始前に電極56及び55の間の全粒子を局在化させるため、電極56を電極55とは別により引き付けが強い電位にすることもできる。

【0068】

#### 5. 1. 2. II型器具

図7は分離器具の好ましい態様であるII型器具の代表的な態様の分解図である。器具10は上部基体11及び底部基体12を含んでいる。I型器具と同様の電極パターン及び接続する電極パッドが底部基体12の平板状の上面に配置されている。あるいは、電極をチャンネル壁が製造された後の非平面部または上部基体11の下面に設置することができる。

【0069】

2つの型の器具のただ1つの差異は、II型器具においては2つの基体の一方に分離方向Sに沿って実質的にまっすぐなチャンネル壁を製造することによって、分離レーンが形成されることである。図7は、底部基体の上部表面で、あらかじめ製造しておいた電極パターンの上に製造された、分離レーン15を形成するチャンネル壁41及び42を示している。I型器具と同様に、分離レーンは電極に露出している。この電極は好ましくは実質的に分離方向Sに直交するか、あまり好ましくはないが、 $48^\circ$ 未満の傾斜角を有している。分離レーンの形状はI型器具のレーン寸法と同様の実質的な矩形である。

【0070】

チャンネル壁が上部及び底部基体によって密閉された分離レーンを形成するように、上部及び底部基体を接合する。電圧源17と電気接続するためパッドを露出させるように、上部基体に底部基体に対する食い違い部を持たせる。

【0071】



図8は、分離方向Sに直交する、図7の軸8-8に沿った器具10の断面図を示している。上部基体11及び底部基体12は3つのチャンネルの境界となっている。チャンネル15は基体の1つの表面に製造された壁41及び42によって境界が作られている。代表的な電極20はチャンネルの底部に沿って伸びている。

#### 【0072】

##### 5. 2. 方法の実施概要

第5. 1節で説明したデバイス中に組み込まれる本発明の方法を図9A~Eに示す。これらの図は、2つのタイプの荷電粒子の分離、すなわち、91としてより大きいロッドによって示されたより大きい粒子タイプと、92としてより小さいロッドによって示されたより小さい粒子タイプとの分離を示している。電位は、曲線90で示されている。図9A、9C、及び9Eでは時間 $t_0$ に対して鋸歯形を仮定し、図9B及び9Dでは時間 $t_1$ に対して平坦形を仮定する。これらの粒子が種々のサイズの一本鎖DNA分子である場合、実際には、分子は球の形状をとる可能性が高くなる。

#### 【0073】

図9Aは分離の開始を示しており、この時点では、すべての粒子が最も左側のポテンシャルウェルにトラップされている。図9Bでは、 $t_1$ に対する電位が平坦形であり、このときは粒子が分離チャンネルに沿って両方向に均等に拡散する。拡散は93として略図で示されている。図9Cでは、再び電位が鋸歯形であると仮定され、右にドリフトして少なくとも距離Rだけ次のポテンシャルウェルの方向に進んだ粒子は、中間のウェルに誘引されてトラップされる。しかしながら、拡散距離がR未満である粒子は、最も左側のもとのポテンシャルウェルに誘引されてトラップされる。より大きい拡散定数を有するより小さい粒子は、より小さい拡散定数を有するより大きい粒子よりも遠くまで拡散する可能性が高く、中間のポテンシャルウェルに達するのは、小さい粒では2つであるが大きい粒子では1つである。図9Dでは、再び電位が平坦形であり、93及び94の両方のポテンシャルウェルから両方向に均等に拡散する。最後に、図9Eでは、再び電位が鋸歯形であると仮定され、小さい粒子のうちの1つは中間のポテンシャル



ウェルから十分に遠くまで拡散して最も右側のウェルに誘引されてトラップされ、2つの小さい粒子は中間のポテンシャルウェルの中に存在する。一方、大きい粒子は十分に遠くまで拡散しないために最も右側のウェルには存在せず、中間のウェルに大きい粒子が1つだけ存在する。従って、より大きい拡散定数を有する粒子はデバイスを介して右側まで選択的に移送されることが分かる。

## 【0074】

粒子の前進運動の差異は粒子の拡散に基づくものである。ポテンシャルウェルが空間的に定在状態にあって、印加時は最小電位に粒子を誘引する働きのみを呈する。電位が印加されていないときの有意な拡散に対して距離Rが著しく大きい場合、粒子はデバイス中で定常状態を保つ。

## 【0075】

特に、DNAの拡散定数Dが分子の寸法に依存することが期待されるため、従って、一本鎖または二本鎖の断片中の塩基の数Nに依存することが期待されるため、この方法によってDNA分子を分離することができる(Doi et al., 1986, The Theory of Polymer Dynamics, Clarendon Press, Oxford, p. 300)。dsDNAの実測値及びssDNAに対する理論予測値は、水溶液に対する値として次のように与えられる：

## 【数1】

$$\begin{aligned} D_{dsDNA} &\approx 1.14 \times 10^{-6} N^{-1} \text{cm}^2/\text{s} \\ D_{ssDNA} &\approx 1.14 \times 10^{-6} N^{-0.59} \text{cm}^2/\text{s} \end{aligned} \quad (1)$$

例えば、Weast, ed., 1987, Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Publishing Co., Boca Raton, FL 及び第5.4節を参照のこと。

## 【0076】

次に、デバイスに対する作動条件についていくつか述べる。電位の分離速度は電位の偏心率に依存し、偏心率が大きくなるほど分離は速くなる。偏心率とは、ポテンシャルウェルに対する電位の最小の位置を意味し、電位の最小が最近接最大に近づくほど電位の偏心率は大きくなる。例えば、同一周期Lを有する一連の鋸歯形電位では、最も小さいR/L比を有する電位のとくに最も速く作動する。

もちろん、 $R$ は、特定の製造技術で得られる構造体サイズ $R'$ よりも実質的に小さくすることはできないし、得られる電位の傾きが分離媒体の破壊電界を超えるほど小さくすることもできない。また、ポテンシャルウェルが少なくとも数百個の独立移動粒子をトラップできるように、 $L$ を十分に大きくすることが好ましい。

#### 【0077】

好ましくは、 $t_{on}$ が $t_{off}$ と比べて適切な範囲内でできるかぎり小さくなるように、電極パッドを横切って印加される電圧 $V$ を十分に大きくすることが必要である。しかしながら、電極において実質的な電解が起こるか、分離媒体の破壊電界を超えるか、または分離媒体の抵抗加熱により分離の分解能が妨げられるほど大きくしてはならない。

#### 【0078】

第5.3節には、実質的に横方向の電極を備えた狭いチャンネル中における分離方法のモデルに基づく $R$ 、 $L$ 、 $R/L$ 、 $t_{on}$ 、 $t_{off}$ 、及び $V$ の選択方法が提示されている。このモデルにより、実際のデバイスに対する作動パラメータを所定の範囲内で正確に予測しなければならない。必要な場合には、通常の実験による最適化処理によって正確な作動パラメータを決定することもできる。例えば、DNA分子を分離する場合、既知の長さを有する断片のはしご型構造体を含んでなるDNA標準を用いてデバイスを作動させることにより、予測される作動パラメータを最適化することができる。

#### 【0079】

本発明の方法は、あらゆるサイズの荷電粒子に適用できる。分離対象となる荷電粒子は、あらゆるサイズの個々の分子から任意の数及び種類の分子の複合体や巨視的な大きさの粒子までに及ぶ。

#### 【0080】

### 5. 3. 方法の実施の詳細

#### 序

この節では、本発明の方法の実施について詳細に説明する。この説明では以下の変数を使用する：

L 電位の空間周期。

【0081】

R 電位の最小から最近接最大までの距離。

【0082】

(Rが $L/2$ よりもどの程度小さいかは電位の各周期の偏心率の測度である)

P 電位の時間的周期 ( $P = t_{on} + t_{off}$ )。

【0083】

f 電位の時間的周波数 ( $f = 1/P$ )。

【0084】

$t_{on}$  電位が印加されている時間。この間に粒子はポテンシャルウェルに誘引されてトラップされる。

【0085】

$t_{off}$  電位が印加されていない時間。この間は粒子が自由に拡散できる。

【0086】

Q 荷電粒子の電荷。

【0087】

$V_0$  印加電位差。

【0088】

T 温度。

【0089】

D 分離対象となる1つのタイプの荷電粒子の拡散定数。

【0090】

$D + \Delta D$  分離対象となるもう1つのタイプの荷電粒子の拡散定数 ( $\Delta D$ は拡散定数の差を意味する)。

【0091】

$N_{cyc}$  完全分離処理に対する電位の時間的サイクルの数。

【0092】

$T_{tot}$  完全分離処理の合計時間 ( $T_{tot} = P * N_{cy}$  及び  $N_{cy} = f * T_{tot}$ )。

【0093】

$V_{drift}$  電位中での荷電粒子のドリフト速度。

【0094】

$L$  分離レーンの全長。

【0095】

第1に、本発明の方法及びデバイスに対する好ましい実施態様を提示する。第2に、作動パラメータ及びデバイスパラメータを最も適切に選択する方法を提示する。第3に、本発明の範囲内の模範的な他の作動モードについて説明する。

【0096】

#### 5. 3. 1. 本発明の実施態様

この節には、本発明の方法の空間的及び時間的変動電位、作動方法のパラメータに対する判定基準、ならびにこれらの判定基準から見て好ましい本発明のモデル、についての説明が含まれる。最初に  $\Delta D \ll D$  と仮定し、続いて  $\Delta D \geq D$  の場合を説明する。

【0097】

#### 電位

図10は、本発明で使用可能な電位  $V(x)$  を分離軸に沿った距離  $x$  の関数として一般的に略図で示している。この電位は、空間周期  $L$  で空間的に反復される。このほかに空間周期をもたない電位を本発明で使用することもできる。電位の各周期に偏心性をもたせ、分離レーンに沿った1つの方向に隣接した最大に電位の最小がより近接するようにしなければならない。この方向は粒子の分離方向  $S$  である。最小と最近接最大との間隔は  $R$  で表され、 $R < L/2$  である。例えば、最小1003は隣接の最大1002から  $L/2$  未満の距離  $R$  だけ離れているが、隣接の最大1001からは  $L/2$  を超える距離  $L - R$  だけ離れている。すべての最小は、 $S$  の方向に隣接した最大により近接している。この電位は、デバイスタイプI及びIIの電極パターンの近傍で発生する電位にほぼ等しい。

【0098】

$V_0 > 0$ の場合、図11A～Dの電位は正に帯電した粒子をSの方向に分離する。この場合、負に帯電した粒子はデバイスを介して反対方向に移送されるが、必ずしも分離する必要はない。負に帯電した粒子をSの方向に分離するためには、電位の極性を反転しなければならない。すなわち、 $V_0 < 0$ としないといけない。後者の場合、正に帯電した粒子はデバイスを介して反対方向に移送されるが、必ずしも分離する必要はない。有利なことに、デバイスの一方の端のローディングゾーンに粒子をローディングし、最初に一方の極性でデバイスを作動させ、次に逆の極性で作動させることにより、両方の荷電粒子を連続的に分離することができる。しかしながら、DNAの分離に特異的な好ましい実施態様では、すべての粒子が負の電荷を有すると考えられる。

#### 【0099】

本発明を実施するにうえて、電位の精密な空間配置 $V(x)$ は重要でない。重要なことは、電位が、分離の軸に沿って交互に出現する電位の最大と電位の最小とをもつことである。ウェルは、ほぼ距離 $L$ だけ離間させる。次に、分離の方向と反対の方向に隣接した最大よりも分離の方向に隣接した最大に各最小がより近接するように、すべての最大及びすべての最小を偏心的に配置しなければならない。最小と最近接最大との距離はほぼ $R$ である。距離 $L$ 及び $R$ は、こうした電位の領域を特徴付けるように便宜的に決められる。本発明の方法は、この制約条件を満足する任意の電位に適用可能であり、ウェルに誘引される電荷の分離方向に粒子を分離する。電位が周期的な類似のポテンシャルウェルをもつことが好ましく、以下の説明ではすべて、空間的周期性を仮定する。しかしながら、空間的周期性が本発明に必要というわけではない。

#### 【0100】

最大の分離効率を得るために、すなわち、最小の分離時間とするために、移動軸を横切る方向に電位が均一であることが好ましい。しかし、電場ベクトルが分離の軸に垂直な成分をもつ場合、言い換えると、分離の方向に沿った変位に垂直な成分をもつ場合、本発明の方法及びデバイスの使用効率は低下する。本発明の実施効率は近似的に $\cos(\theta)$ である。ただし、 $\theta$ は分離方向に沿った変位に対する電場ベクトルの角度である。従って、電場と分離方向との間のほぼすべての相



対方向に対して本発明は機能することが分かる。しかしながら、すべての電場ベクトルが分離の軸に実質的に沿っていることが好ましい。この場合、実質的に沿っているとは、 $\theta$  が約  $45 \sim 50^\circ$  未満であること、すなわち、 $\cos(\theta)$  が約 0.5 より大きいことを意味する。

#### 【0101】

更に、本発明の特定の実施態様において、電位の横方向の不均一性の影響を最小限に抑えるように作動パラメータを調節することが可能である。例えば、電位が分離レーンに隣接した電極により発生され、かつ、電位が、例えば、デバイスタイプ I 及び II において、時間  $t_{on}$  に対する実質的にオフ状態から時間  $t_{off}$  に対する実質的にオン状態へ変化する実施態様では、好ましい分離レーン幅と比較したときの電極サイズ及び間隔が原因で移動軸の横方向に不均一になる可能性がある。電位は電極から離れるにつれて減衰するため、ポテンシャルウェルは電極に最も近いところで最も深くなる。最小の電極間隔よりもレーン幅が大きい場合及び電極がチャンネルを完全に包囲しない場合、電極から最も遠いレーンの側面でポテンシャルウェルが弱くなる可能性がある。しかしながら、このことは本発明では問題にはならない。なぜなら、第 1 に、荷電粒子を電極に誘引してトラップするように  $t_{on}$  は最適に選択され、更に、粒子が最長でも電極間隔にほぼ等しい距離を拡散するように  $t_{off}$  は最適に選択されるからである。従って、分離される粒子は、デバイスの最適作動中、比較的深いポテンシャルウェルの領域に滞留するため、電極の上の電位の不均一さは実質的に無視できる。また、分離レーン壁の近傍の電位が乱れる可能性もある。この場合にも、荷電粒子はポテンシャルウェルの比較的深い場所に滞留するため、不均一さは実質的に無視できる。

#### 【0102】

電位はまた時間的にも変化する。この場合に必要なことは、粒子が空間的ポテンシャルウェルに誘引されてトラップされる第 1 の強さから、最近接ポテンシャルウェルへの拡散の確率がゼロではないが粒子が比較的自由に両方向に拡散する第 2 の強さまで、電位を変化させることだけである。この確率は 0.1% 以下の極めて小さい値かまたはほぼ 100% の極めて大きい値であってよい。可能なか

ぎり迅速な分離が行えるように最適化を行うことが好ましい。便宜的な都合だけのために、以下の説明では、時間的变化は周期的で、周期  $P$  及び周波数  $f$  を有し、オン状態とオフ状態との間で変化するものと仮定するが、これに限定されるものではない。時間  $t_{on}$  に対しては電位  $\pm V_0/2$  を印加し、時間  $t_{off}$  では電位を印加しない。従って、時間  $T$  の作動の各サイクル中、電位は時間  $t_{on}$  ではオン状態、時間  $t_{off}$  ではオフ状態である。ただし、 $t_{on} + t_{off} = T$  及び  $f = 1/T$  である。

### 【0103】

本発明の方法は時間的に周期的な2つの状態の電位を用いてモデル化されるが、他の変化を有する電位を本発明に使用することもできる。第1に、時間的变化が周期的である必要はない。例えば、分離が進むにつれて、時間的周期を体系的に変化させてもよい。第2に、サイクル中に他の状態が含まれていてもよい。例えば、パラメータ  $R$  がより小さい値になるように、各サイクルの開始時にウェルの底に粒子をより強く集中させるための状態が含まれていてもよい。電位を時間と共に連続的に変化させてもよい。

### 【0104】

#### 方法パラメータの好ましい制約条件

電位がオン状態の場合、ポテンシャルウェルは、分離される荷電粒子を熱じょう乱に対抗して誘引してトラップすべく十分に深くなければならない。この条件は、 $V_0$  が十分に大きく以下の不等式が成立する場合に満足される。

### 【0105】

#### 【数2】

$$\frac{V_0 Q}{k_B T} \gg 1$$

(2)

( $k_B$  はボルツマン定数である)

電位がオフ状態の場合、1つのウェルの中の拡散定数  $D$  の粒子は、次のポテンシャルウェルに向かって分離の方向に距離  $R$  だけ拡散する確率  $\alpha_D$  をもたなければならない。この確率は、有利には、できるかぎり迅速に分離が行われるように

$t_{off}$  を最適化することによって決められる。本発明のための好ましいモデルにおいて、この条件は、次式：

【数3】

$$\alpha_D = 1/2 \operatorname{erfc}\left(\frac{R}{\sqrt{4Dt_{off}}}\right) \quad (3)$$

によって与えられる  $R$  と  $t_{off}$  との関係として表される。ただし、「erfc」は補充誤差関数である。

【0106】

更に、電位がオフ状態の場合、拡散定数  $D$  の粒子は、前のポテンシャルウェルに向かって距離  $L - R$  だけ拡散して戻る確率をもつはずであるが、この確率は好ましくは  $\alpha_D / 100$  未満である。本発明のための好ましいモデルにおいて、こうした結果は、 $R$  と  $L$  と  $\alpha_D$  とが次の条件を満足するときに得られる。

【0107】

【数4】

$$\sqrt{4Dt_{off}} \leq R \ll L \quad (4)$$

粒子が距離  $L + R$  だけ拡散して次の最近接ウェルより先にあるポテンシャルウェルまで達する確率は、距離  $L - R$  だけ拡散して戻る確率よりも必然的に小さい。

【0108】

これらの条件は容易に満足される。例えば、 $\alpha_D = 0.05$  及び  $R/L = 0.1$  の場合、逆方向に拡散する確率は極端に小さい約  $10^{-50}$  であり、1つのポテンシャルウェルを越えて拡散する確率は更に小さい。

【0109】

好ましいモデル

本発明の方法のための作動パラメータ及び本発明のデバイスのための設計パラメータを選択するうえで、様々なモデルを構成することが可能である。例えば、

実際に使用される電極により発生される電位の正確な空間的及び時間的構造、ならびにこのような電位に暴露される分離媒体中の荷電粒子の正確な動きは、電磁気及び粒子運動の既知の微分方程式を解くことによって決定することが可能である。これらの方程式は標準的な方法により数値的に解くことができる(Press et al., 1992, Numerical Recipes in C, 2nd ed., Cambridge Univ. Press, New York (数値解法の解説書))。この代わりに、適切な結果を与える近似モデルを構築したり、実際のデバイスを用いた実験に基づいてパラメータを最適化することも好ましい。この好ましい方法によれば、正確なモデルを用いた場合よりも短時間にかつ低コストで、作動パラメータ及び設計パラメータに対する適切な精度が得られる。

#### 【0110】

好ましい近似モデルでは、本発明の方法及びデバイスを、ドリフトを有するランダムウォークとして記述する。例えば、Wax, ed, 1954, Selected Papers on Noise and Stochastic Processes, Dover Publishers, New Yorkを参照のこと。ランダムウォーク成分は、電位がオフ状態のときの粒子の拡散によって生じ、ドリフト成分は、電位がオン状態のときに電位の最小に粒子がトラップされることによって生じる。本明細書中では、距離 $L$ 及び $R$ により特徴付けられる好ましいほぼ鋸歯形の電位、ならびにローディングゾーン中の1つのポテンシャルウェルに初期にトラップされた粒子、を参照しながら好ましいモデルについて説明する。この場合、電位の各サイクル中の分離の方向へのドリフトは $\alpha_D L$ である。ただし、 $\alpha_D$ は、拡散定数 $D$ の粒子が距離 $R$ だけ拡散して最近接ウェル中へ入る確率である。好ましいパラメータ制約条件下では、粒子が後退または前進して1つのポテンシャルウェルを越えて拡散する確率は無視できる。電位サイクルごとの粒子位置の平方偏差は、 $(\alpha_D - \alpha_D^2) L^2$ に従って増加する。中心極限定理により、多くのポテンシャルウェルにわたり観測される粒子の濃度プロファイルはガウス分布になる。例えば、Wax, ed, 1954, Selected Papers on Noise and Stochastic Processes, Dover Publishers, New Yorkを参照のこと。

#### 【0111】

従って、時間 $t$ を経た後すなわち $t f$ サイクル後の粒子濃度のガウス分布はく



$x_D(t)$  と呼ばれるピークを有し、このピークは次式：

【数5】

$$\langle x_D(t) \rangle = t f \alpha_D L \quad (5)$$

で与えられる。粒子濃度のガウス分布の半値幅は  $\delta x_D(t)$  と呼ばれ、次式：

【数6】

$$[\langle \delta x_D^2(t) \rangle]^{1/2} = [\langle x_D(t) L (1 - \alpha_D) \rangle]^{1/2} \quad (6)$$

で与えられる。これらの式により、いくつかのポテンシャルウェルを横切る粒子濃度の特徴付けがなされる。

【0112】

電位がオフ状態のときは粒子が自由に拡散するため、 $\alpha_D$  は、時間  $t$ 。、の間に右方向に少なくとも距離  $R$  だけ拡散する粒子の部分として計算することができる。標準的な拡散の理論によれば、これは次式：

【数7】

$$\alpha_D = \frac{1}{2} \operatorname{erfc}\left(R / \sqrt{4 D t_{off}}\right) \quad (7)$$

で与えられる。例えば、Wax, ed, 1954, Selected Papers on Noise and Stochastic Processes, Dover Publishers, New Yorkを参照のこと。この式において、補充誤差関数は、次式：

【数8】

$$\operatorname{erfc}(x) = (2 / \sqrt{\pi}) \int_x^{\infty} dt \exp(-t^2). \quad (8)$$

で定義される。 $\operatorname{erfc}(x)$  に対する多項式近似については、Abramowitz et al., 1972, Handbook of Mathematical Functions, Dover Publishers, New Yorkに記載がある。 $\alpha_D$  に対する式7では、各ポテンシャルウェル中の粒子の初期分布は非常に幅が狭いと仮定する。実際には、電位が有限な幅をもつときに各ウェルの底

にトラップされる粒子の初期密度分布の幅は、電極の幅程度である。しかしながら、この差は $\alpha_D$ の数値的記述に影響を与えるにすぎない。これは特に式5及び6のモデルに影響を及ぼすことはない。なぜなら、これらの場合はいずれも、 $\alpha_D$ が拡散性Dに関数的にどのように依存するかが分かっている必要があるからである。

#### 【0113】

このモデルは、異なる拡散性の粒子種が本発明によってどのように分離されるかを示す。第1に、式5及び7は、より大きな拡散性をもつ種がより小さな拡散性をもつ種よりも速く分離の方向に移送されることを示している。式5はまた、異なる拡散性の種の分離が時間 $t$ と共にまたは同じようにサイクル数 $N_{cy}$ と共に直線的に進行することを示している。第2に、式6は、それぞれの種の濃度プロファイルの幅が $t^{1/2}$ と共に増大することを示している。十分な数の電位のサイクルの後では、それぞれの種に対する濃度プロファイルの分離は任意の種の濃度プロファイルの幅よりも速く進行するため、異なる拡散性の種に関連した濃度ピークは観測できる程度に空間的に分離される。

#### 【0114】

更に、式7は、分離に必要な時間がデバイスの構造体サイズにどのように依存するかを示している。種の濃度プロファイルの形状及び種の分離の速度は、確率パラメータ $\alpha_D$ によって完全に決まる。このパラメータはまた、補充誤差関数の変数だけに依存するため、構造体サイズ $R$ の変化は、時間 $t_{cy}$ の変化によりバランスをとることができ、この変数は不変のままに保たれる。 $R$ は直線的に関与し、 $t_{cy}$ は平方根の形で関与するため、構造体サイズ $R$ が $1/2$ に減少すると分離に必要な時間は $1/4$ に減少する。デバイスの全体の長さは $R$ と共に直線的に増大する（一定の $R/L$ において）。従って、十分に小さいデバイス長では、分離はより迅速に行われる。この場合、微細加工技術の進歩を利用して構造体サイズを減少させれば、デバイスの性能を直接向上させることができる。デバイスは、先に述べた最小、すなわち、分離される粒子のサイズよりも桁数の大きい値、を越える大きさでなければならない。

#### 【0115】

図11A～D及び図12A～Eは、このモデルに従った本発明の実施状態を示している。図11A～Dは、1101及び1102として略図で示されている2つの隣接したポテンシャルウェル中における異なる拡散性の2種の粒子A及びBの詳細な濃度プロファイルを示している。ただし、種Bは種Aよりも大きい拡散性を有する。Rとしても表記されている位置1108は、最小1101に隣接した最近接電位最大である。図11Aにおいて、電位1107はオン状態にあり、粒子は初期ポテンシャルウェル1101に誘引され、式2による熱拡散に対抗して強くトラップされている。種A及び種Bの濃度プロファイル1103及び1104は、各ウェル中でほぼガウス型である。図11Bにおいて、電位はオフ状態に切り換えられ、分子は、分離媒体中を分子の拡散性に従った速度で両方向に拡散する。このときには、種A及びBは、より幅の広いガウス型の濃度プロファイル1103及び1104を有する。ただし、種Bの方が拡散性が大きいので、種Bのプロファイル1104の方が幅が広い。プロファイル1103の種Aの一部及びプロファイル1104の種Bのより多くの部分は、隣接した最大1108を越えて拡散する。図11Cにおいて、電位は再びオン状態に切り換えられ、粒子は再びウェル1101及び1102に誘引されて強くトラップされる。しかしながら、このときには、最大1108を越えて拡散する粒子はウェル1102にトラップされ、種A及び種Bは濃度プロファイル1105及び1106を示す。これらの粒子はウェルを1つ越えて前方にドリフトする。図11Dにおいて、電位は再びオフ状態に切り換えられ、両方の種が両方のウェルから外側に向けて拡散する。電位の対称性に基づいて、分子の濃度プロファイルは、より大きい拡散性の種がより速く移送されるように選択的に右方向に移動した。

#### 【0116】

図12A～Eは、多くのポテンシャルウェルを含むスケールでの本発明のモデルの実施状態を示している。これらの図は、ドリフトモデルを用いたランダムウォークに基づいて正確な計算から作成したものである。水平軸は分離の方向に沿っており、30個のポテンシャルウェルを含む。垂直軸は、分離される2つの荷電粒子種A及びBの濃度を表している。拡散性の低い方の種Aはバー1201で表され、拡散性の高い方の種Bはバー1202で表されている。時間 $t_n$ 及び

$t_{rr}$  は、記載の方法に従って最適に選択される。図12Aは、両方の種が第1のポテンシャルウェルにのみトラップされている初期状態を示している。図12B、12C、12D、及び12Eは、それぞれ25サイクル後、50サイクル後、75サイクル後、及び100サイクル後の両方の種の濃度プロファイルを示している。これらのプロファイルは、中央極限定理に従って、サイクル数が増大すると多くのポテンシャルウェルにわたりガウス分布するようになる。図12B～Eより、種Bが種Aよりも速く右方向に移送され、かつ両方の濃度プロファイルが時間と共に広がり呈することは明らかである。また、濃度ピークが濃度プロファイルの広がりよりも速く分かれて移動するために種が分離されることは明らかである。

【0117】

#### 5. 3. 2. 最適パラメータの選択

方法の作動パラメータ及びデバイスの設計パラメータの最適な選択は、粒子の分離特性のうちのどれを最適化するか依存する。この節では、好ましいモデルによる分離時間を最小化するための方法について説明する。デバイス、電位、及び粒子移送に関するより多くの詳細な構造を組み込んだより現実的なデバイスモデルに対しても同じ方法が適用できることは明らかであろう。このほか、好ましいモデル及びより複雑なモデルによる類似の方法を用いて、当業者は、例えば分離の空間的距離など、他の分離特性を最適化することもできる。

【0118】

好ましい作動パラメータは、電位のサイクル時間  $t_{on} + t_{rr}$  によって決まる全分離時間を最小化するように選択される。この節では、第1に、 $t_{on}$  及び関連パラメータの最適化、第2に、 $t_{rr}$  及び関連パラメータの最適化について説明する。

【0119】

これらの方法により選択されたパラメータは、必然的に近似的なものである。実際のデバイスを用いた通常の実験により決定された本明細書中に記載のパラメータから、より正確な最適パラメータを決定することができる。更に、任意の方法により決定された正確な最適パラメータを用いて実際のデバイスを作動させる



必要はない。例えば、利用可能な装置の特性、作動パラメータの設定の誤差などを考慮に入れて、正確な最適値から僅かにまたはかなりずれたパラメータを用いて実際のデバイスを作動させることができることは、当業者には分かるであろう。最適状態を得るために、決定されたパラメータに近いところでデバイスを作動させることが好ましいというだけである。

#### 【0120】

本明細書中に記載の方法は、C、Basic、Fortranなどの適切なコンピュータ言語への通常の変換を行うことにより、コンピュータプログラムとして実行することができる。このコンピュータプログラムにより汎用コンピュータシステムに指令を与え、記載のパラメータ選択方法を実行することができる。このようなコンピュータシステムとしては、例えばIBM PCまたはそれと同等なPCが挙げられる。

#### 【0121】

$t_{on}$  及び関連パラメータの好ましい最適化

$t_{on}$  ができるかぎり小さくなるように操作及び装置のパラメータを選択することが好ましい。ここで、まず第1に、 $t_{on}$  と関連パラメータの関係を示す関係式が好ましいモデルに従って決定され、第2に、これらのパラメータについての最適な値を決定するためにこれらの関係式が用いられる。

#### 【0122】

時間  $t_{on}$  は、荷電粒子が、ポテンシャルの影響下で分離方向に、そのポテンシャルにおける最大値からそれに続く最小値まで、つまり距離  $L-R$  だけドリフトするための時間である。例えば、図10において、 $t_{on}$  は、粒子が1001から1003までドリフトする時間である。この時間は、次の式から得られる。

#### 【0123】

【数9】

$$t_{on} = (L-R)/V_{drift} \quad (9)$$

なお式中、 $V_{drift}$  は、そのポテンシャルにおける粒子のドリフト速度である。

【0124】

分離媒質中の粒子の運動は過剰減衰されることから、 $V_{drift}$  は、電位に由来する力に摩擦係数を乗じたものに正比例し、以下の式から求められる：

【数10】

$$V_{drift} = \gamma Q \left( \frac{V_0}{L-R} \right). \quad (10)$$

ここで、ポテンシャルは偏心的でなくてはならないため  $R < L/2$  である点に留意されたい。ドリフトの適切な領域における電界  $E$  は、 $-V_0 / (L-R)$  である。摩擦係数  $\gamma$  は、変動-散逸の定理により拡散定数に次のように関係づけられる。

【0125】

【数11】

$$\gamma = D/k_B T. \quad (11)$$

例えば、Wax, ed, 15954, Selected Papers on Noise and Stochastic Processes 雑音及び確率過程に関する選択論文集、Dover Publishers, New Yorkを参照のこと。これらの式を組合わせて、 $t_{on}$  は、以下の式から求められる：

【数12】

$$t_{on} = \frac{k_B T (L-R)^2}{Q D V_0} \quad (12)$$

従って、式12により、 $L-R$ がわかっているため、最小値ひいては最も好ましい  $t_{on}$  を計算することができる。さらに、 $V_0$  は、使用される分離媒質の破壊電界及び電解しきい値よりも低い残留電界と一貫性のある、できるかぎり大きいものとなるように選択されるべきである。最大電界  $E_{max}$  は、ポテンシャルのより急な側に沿って発生し、次の式から求められる。

【0126】

【数13】

$$E_{\max} = \frac{V_0}{R} \quad (13)$$

最適には装置をできるかぎり限界電界近くで作動させるべきである。この場合、 $t_{on}$  は、次の式から求められる。

【0127】

【数14】

$$t_{on} = \frac{k_b T (L - R)^2}{QDRE_{\max}} \quad (14)$$

例えば、水の場合、限界破壊電界は約  $10^4$  V/cm である (Avallone et al. eds., 1987, Mark's Standard Handbook for Mechanical Engineers (機械技師のための Marks 標準ハンドブック)、マグローヒル、ニューヨーク p15~19)。従って、 $E_{\max} = 10^4$  V/cm で  $R = 1 \mu\text{m}$  である場合、最大  $V_0$  は 1 V である。

【0128】

$t_{off}$  及び関連パラメータの好ましい最適化

$t_{off}$  及び関連パラメータを最適に選択するためには、拡散率  $D + \Delta D$  のタイプから拡散率  $D$  の粒子タイプを首尾よく分離することが何を意味するかを規定する必要がある。本節では、 $\Delta D$  が  $D$  よりもはるかに小さいと仮定されている。好ましい1つの分離仕様は、装置からの2つのタイプの粒子の濃度ピークの退出時間の差異が少なくとも濃度ピークの広がりと同じ位大きい時点で分離が発生するというものである。この場合、2つのタイプの粒子の濃度プロファイルを経験により区別することが可能である。あるいは別の表現では、2つのタイプの粒子の濃度ピークの位置差が少なくとも2つのピークのガウスの広がりと同じ位大きい時間又はサイクル数において分離が発生するということである。例えば図12A、12B及び12Cで、2つの濃度ピークは、この好ましい仕様に従うと、分離されているとはみなされない。しかしながら、図12D及び12Eでは、ピークは分離されているとみなされる。操作パラメータを選択するには、多少厳しさが増減した代替的な分離仕様を利用することも可能である。厳しさがより

少ない条件であれば、例えば図12Cを、同じく分離されたものとみなす可能性がある。

【0129】

この好ましい分離仕様に従うと、分離は、以下の式から得られる時間  $t_D$  において発生する：

【数15】

$$(x_D(t_D)) - (x_{D+\Delta D}(t_D)) = [\langle \delta x_D^2(t_D) \rangle]^{1/2}, \quad (15)$$

ここで、拡散率  $D$  の粒子が装置を横断するのに必要とされる時間である時間  $t_D$  を経過した後、装置から退出した時点で、2つのタイプの粒子の濃度プロファイルは分離される。

【0130】

式5及び6から、分離条件を次のように表わすことができる：

【数16】

$$t_D f(\alpha_D - \alpha_{D+\Delta D}) L = \sqrt{t_D f \alpha_D L^2 (1 - \alpha_D)}, \quad (16)$$

なお式中、 $\alpha_D$  は、拡散率  $D$  の粒子が  $t_D$  の間に次のポテンシャルウェルまで拡散する確率である。 $\alpha_D$  は、ここで便宜上繰返し示す式7によって求められる。

【0131】

【数17】

$$\alpha_D = \frac{1}{2} \operatorname{erfc}\left(R / \sqrt{4 D t_{\text{off}}}\right) \quad (17)$$

式16より、拡散率  $D$  の粒子を拡散率  $D + \Delta D$  の粒子から分離するのに必要とされるサイクル数  $N_{\text{cyc}} (= t_N f)$  は、次の式から得られる：

【数18】



$$N_{cyc} = \alpha_D (1 - \alpha_D) / (\alpha_D - \alpha_{D+\Delta D})^2. \quad (18)$$

差  $\alpha_D - \alpha_{D+\Delta D}$  は、十分に小さな  $\Delta D$  については  $-\Delta D \delta \alpha_D / \delta D$  として近似することができる。合計分離時間は、以下の通りである：

【数19】

$$T_{tot} = N_{cyc} (t_{on} + t_{off}) \quad (19)$$

好ましい最適なパラメータは、 $T_{tot}$  を最小にするように選択される。操作及び装置パラメータは、予め  $t_{on}$  を最小にするように選択されている。 $T_{tot}$  は、式19を通して直接  $t_{off}$  に左右されると同時に、次に  $t_{off}$  に影響される  $\alpha_D$  に  $N_{cyc}$  が依存していることから、間接的にも  $t_{off}$  によって左右される。 $t_{off}$  の最適な値を選択するためには、これらの式全てが一緒に最小にされなくてはならない。この最小化は、標準的な数値的方法、例えば最小値が見出されるまで  $t_{off}$  についてのさまざまな値を系統的に試すことによって最も容易に行なわれる。例えば Press et al., 1992, Numerical Recipes in C (Cの数値的配合表)、第2版, Cambridge Univ. Press, New York を参照のこと。最適な  $t_{off}$  の選択例は、DNA断片分離の場合について第5.4節に記されている。

【0132】

最適な  $t_{off}$  及び  $N_{cyc}$  値がひとたび選択された時点で、分離のために必要とされる合計装置長は、次の式から得られる：

【数20】

$$L_{tot} = \langle x_D(t_D) \rangle = N_{cyc} \alpha_D L. \quad (20)$$

選択される好ましい最適な数量は、ポテンシャルの空間特性によって左右される。

【0133】

L及びRの好ましい最適化

$t_{on}$  及び  $t_{off}$  の前述の最適化では、R及びLが固定されていると仮定し

ている。これらの長さを変動させることができる場合、これらは、以前の最適な時間パラメータの決定を考慮して選択すべきである。まず第1に式14を考慮して、 $L$ はできるかぎり小さく選択すべきである。第2に、式17を考慮して、 $R$ の2分の1削減は $t_{0.1}$ における4分の1の減少を可能にすることから、 $R$ はできるかぎり小さく選択すべきである。第3に、ポテンシャルウェルの充分な偏心率を得るには、 $R/L < 0.3$ であることが好ましい。そして第4に、 $R$ 及び $L$ は少なくとも、選択された製造技術が許容する最小寸法と同じ位大きいものに制限される。これらの $R$ についての矛盾する要求は、固定された $E_{max}$  ( $V_0$ は変動している)をもつ選択された分離媒質について最適な $R$ が存在することを意味している。

#### 【0134】

最適化のための好ましい方法において、分離時間 $T_{0.1}$ は、結果として得られる装置のサイズが、選択された製造技術により製造可能であるという制約条件の下で、 $L$ 及び $R$ の関数として最小化される。1つの付加的な制約条件としては、 $L$ 及び $R$ の各々の値について、電界が破壊電界 $E_{max}$ よりも小さくなるように、適用されるポテンシャル $V_0$ を選択することが最適であるというものがある。この $V_0$ の値のため、時間 $t_{0.1}$ 及び $t_{0.2}$ は、前述したとおり、一定の与えられた $L$ 及び $R$ について最適な $T_{0.1}$ に到達するよう最適な方法で選択される。コンピュータ技術の当業者にとっては周知のものである多次元最小化技術を用いて (Press et al., 1992, Numerical Recipes in C (Cの数値的配合表) 第2版, Cambridge Univ. Press, New York)、このとき $L$ 及び $R$ の最適な対は、この最適化問題から容易にかつ好ましい形で決定される。

#### 【0135】

もう1つの方法においては、最適な $R$ は、式14、17、18及び19の技術的に許容された範囲内での同時最小化によって決定され得る。これは、Press et al. からの標準的な数値的技術により実行可能である。あるいは、この最適化は、以下の単純な検索手順により実行できる。最小許容範囲における初期 $R$ を選び取り、前述の方法により最適値 $T_{0.1}$ を決定する。 $R$ を幾分かの分画だけ、例えば5%だけ増加させ、最適な $T_{0.1}$ の決定をくり返す。 $T_{0.1}$ の全ての決

定について、選択された一定の与えられた分離媒質の中で適用可能な $V_0$ の最大値を選択する。 $R$ についての低い方の範囲又は $R$ の中間値のいずれかで、 $T_{i,0}$ の最小値が発見されるまで、この反復を続ける。 $R$ の好ましい値は、 $T_{i,0}$ を最小にするものである。 $R$ を選択した時点で、好ましくはポテンシャルウェルの十分な偏心率を提供する固定値を $R/L$ が有するように、 $L$ を決定することができる。好ましくは $R/L$ は0.3未満であり、より好ましくは約0.1である。

#### 【0136】

以下のサンプル計算全てについて、特にことわりのない限り、最適値は $R = 1 \mu m$ 及び $L = 10 \mu m$ であると仮定されている。この周期性をもつポテンシャルが、第5.5節に記述されているもののよう、共通のマイクロ製造技術によって容易に生成される。

#### 【0137】

最後に、分離媒質は、分離すべき粒子が媒質内において荷電された状態で懸濁させられ、懸濁状態で異なる拡散率をもつように選択されるべきである。拡散率の差が大きくなればなるほど、媒質は好ましいものとなる。さらに、分離媒質が、その他の適当な媒質に比べ比較的高い $E_{max}$ 及び比較的高い電解電圧をもつようその他の点では適当な媒質の中から選択されることが好ましい。ここでは、比較的高いという語は、その他の点では適当な媒質について少なくとも平均値超を意味するものと考えることができる。これらの条件は、最小値 $t_{0,n}$ を許容する。最後に、分離媒質がポテンシャルウェルの遮蔽を最低限にするため低いイオン強度をもつことが好ましい。

#### 【0138】

### 5.3.3. 拡散率が大幅に変動する場合

以上の節では、分離すべき粒子が類似した拡散率をもつ場合についての、好ましいモデル及びそのモデルを考慮した好ましい操作及び装置パラメータの決定について記述してきた。本発明はまた、拡散率が大幅に変動する粒子を含有する混合物にも適用可能である。

#### 【0139】

このような混合物を分離するための1つの操作形態は、 $t_{0,n}$ 及び $t_{0,i}$ が

より高い拡散率の粒子を分離するために最適な短かい時間にある状態で開始することにある。これらの時間では、拡散率がより高い粒子が急速に分離される。しかしながら、拡散率のより低い粒子は、はるかに小さい $\alpha_D$ 値をもち、ほぼ静止状態にとどまる。より拡散率の高い粒子が分離された後、時間 $t_{on}$ 及び $t_{off}$ は、拡散率のより低い粒子の分離のために最適なより大きな値まで増大させられる。このとき、拡散率のより低い粒子はその後急速に分離される。

#### 【0140】

このような混合物を分離するためのもう1つの操作様式は、拡散率のより低い粒子に適切なより長い $t_{on}$ 及び $t_{off}$ 時間を用いるものである。このようなより長い時間では、拡散率のより高い粒子はより大きな $\alpha_D$ 値を有し、複数のポテンシャルウェルを順方向ならびに逆方向に拡散させる能力をもち得る。前述のモデルでは、分離すべき粒子が移動しなかったか又は、せいぜい1つのポテンシャルウェルを $t_{off}$ 中に順方向に拡散したかのいずれかであると仮定されたい。しかしながら、分離すべき粒子のいくつかは、 $t_{off}$ 中に複数のポテンシャルウェルを拡散させる場合については、ドリフトを伴うランダムウォークに基づく類似のモデルを構築することができる。

#### 【0141】

このようなモデルを構築するためには、拡散率 $D$ の粒子が、自由拡散のため時間 $t_{off}$ 中に $n$ 個のポテンシャルウェルを拡散させる確率として、 $\alpha_D^{(n)}$ を定義づける。式7に類似の仕方で標準的拡散理論に従うと、これらの $\alpha$ は以下の式から得られる。

#### 【0142】

#### 【数21】

$$\alpha_D^{(n)} = \frac{1}{\sqrt{4nDt_{off}}} \int_{R \cdot (n-1)L}^{R \cdot nL} dx \exp(-x^2/4Dt_{off}) \quad (21)$$

拡散率 $D$ が $t_{off}$ に比べ比較的小さい場合、 $\alpha_D^{(1)}$ は急速に式7の $\alpha_D$ の値に近づく。この場合、 $\alpha_D^{(1)}$ 及び $\alpha_D^{(0)}$ （粒子が置かれた状態にとどまる確率）は、唯一の非ゼロ $\alpha_D^{(n)}$ であり、このことは、粒子が置かれた状態にとど



まるか又は順方向に単一のポテンシャルウェルの間隔だけ拡散するかのいずれかであることを意味する。ただし、拡散率が比較的大きい場合、 $n = -1, 2$ などについての $\alpha_D^{(n)}$ は大きいものとなり得る。

【0143】

粒子が $t_0$ 中に複数のポテンシャルウェルを拡散できる場合において発明をモデリングするためには、パラメータ $\alpha_D$ を有効な確率の高い拡散距離として定義づけし直す。

【0144】

【数22】

$$\alpha_D = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \alpha_D^{(n)} n. \quad (22)$$

この定義では、ここでも $\langle x_D(t) \rangle$ と呼ばれるガウス様の粒子濃度プロフィールの最大値の平均的位置は、次の式により求められる：

【数23】

$$\langle x_D(t) \rangle = t f \alpha_D L \quad (23)$$

これは、粒子がせいぜい1つのポテンシャルウェルだけ拡散すると仮定された前述のモデルの式5と同じである。

【0145】

ここでも $\delta x_D(t)$ と呼ばれる、合計時間 $t$ の後の拡散率 $D$ の粒子のガウス様粒子濃度プロフィール内のばらつきは、その後

【数24】

$$\begin{aligned} \langle \delta x_D^2 \rangle &= \langle x_D^2 \rangle - \langle x_D \rangle^2 \\ &= \sum_{n=-\infty}^{\infty} \alpha_D^{(n)} n^2 L^2 - \alpha_D^2 L^2 \end{aligned} \quad (24)$$

から得られる単一サイクルについてのばらつき変化 $\langle \delta x_D^2 \rangle$ を $t f$ である時間 $t$ 内の拡散サイクル数に乗じたものに等しい。

【0146】

ここでもまた、この場合 $\Delta D$ が $D$ 以上の大きさを表す拡散率 $D + \Delta D$ の粒子からの拡散率 $D$ の粒子の分離の発生を定義する好ましい条件は、濃度ピーク間の距離が濃度プロファイルの幅の半分以上の大きさでなくてはならないというものである。式23及び24から、分離のためのこの条件は、次の式より得られる。

【0147】

【数25】

$$N_{cyc} I(\alpha_D - \alpha_{D+\Delta D}) = \sqrt{N_{cyc} \langle \delta x_D^2 \rangle}. \quad (25)$$

これらの式は、 $\Delta D \ll D$ である前述の場合と同様、 $\Delta D$ がおおよそ $D$ 以上であるこの場合についても同じ結論を可能にする。前述の通り、式21及び23は、より大きい拡散率をもつ粒子がより小さな拡散率の粒子よりも急速に装置を通して移送されること、そして濃度ピーク間の距離が時間と共に線形的に増大することを立証している。式25は、異なる拡散率のピークが分離されることを立証している。ここでもまた、濃度ピークの幅で $N_{cyc}$ の平方根として増大するにすぎないのに対し、濃度プロファイル間の距離が $N_{cyc}$ と共に線形的に増大することから、分離が発生する。さらに、式21の挙動のため、分離時間は、ポテンシャルの空間スケールでの2分の1減少毎に4分の1に減少させられる。

【0148】

さらに $t_{opt}$ を最適化する操作パラメータを、前述の場合と類似した仕方を選択することができる。例えば、 $N_{cyc}$ は、次の式により求められる：

【数26】

$$N_{cyc} = \frac{\sum_{n=1}^{\infty} \alpha_D^{(n)} n^2 - \alpha_D^2}{(\alpha_D - \alpha_{D+\Delta D})^2} \quad (26)$$

これは、式18の形態に対応する。従って、 $T_{opt}$ を最小にする $t_{opt}$ は、 $t_{opt}$ 中に粒子がせいぜい1つのポテンシャルウェルだけ拡散した前述のケースに類似した形で式19、21、22及び26の数値的最小化により得ること

ができる。

#### 【0149】

このようにして、より拡散率の高い粒子が $t_{off}$ 中に複数のポテンシャルウェルを拡散させるように操作パラメータが選択される場合でさえも、該方法によって、拡散率が大幅に変動する粒子の混合物を分離することが可能である。このような混合物を分離するための1つの操作形態においては、サイクル時間 $t_{on}$ 及び $t_{off}$ を、まず最初に拡散率のより高い粒子の急速な分離のために最適化させ、次に拡散率のより低い粒子の分離のために最適化されたより大きな値まで漸進的に増大させることができる。第2の操作形態においては、サイクル時間を最大断片を分離するように最適化させ、それでもなおより小さな断片のための適切な分離を提供することが可能である。

#### 【0150】

##### 5.3.4. 代替的操作形態：多数の状態

もう1つの操作形態は、2つの状態ではなく3つの状態を通してポテンシャルをサイクルさせることからなる。これら3つの状態は、以下の段階を含む：

1. ポテンシャルをオンに切替える；
2. オン条件の間に1回又は複数回ポテンシャルを短く反転させる；
3. 自由拡散を可能にする。

#### 【0151】

オン条件の間にポテンシャルを1回又は複数回短かく反転させることは、ポテンシャルウェル又は電極にひきつけられた小くて移動度の高い対イオンにより形成されたイオン2重層からの静電遮蔽を低減させる上で有効であり得る。ポテンシャルの極性が反転させられるいくつかの高速パルスに $t_{on}$ を散在させることによって、これらの対イオンを移動させ2重層を最小にすることができる。好ましくは、より大きい、移動度のより低い粒子の分布に対し実質的に全く影響のないものの移動度の高い、より小さい対イオンがポテンシャルウェルから外へ又は電極から逆方向に移動させられるように、反転周期は充分小さいものである。これは不等式 $t_{off} \ll t_{on}$ 、 $t_{off}$ を満たすことで達成される。

#### 【0152】

もう1つの3状態操作形態では、タイプI及びIIの装置内に存在する2組の電極の間の第3の電極により作り出すことができるような、各々のポテンシャルウェルの底を中心とする急で実質的に対称的なV字形ポテンシャルを伴う第3の状態が用いられる。本実施形態の電極は、Lという周期性で、相対的位置 $-R$ 、 $0$ 、及び $R$ に位置設定されている。時間 $t_0$ だけ継続する第1の状態では、相対的位置 $0$ にある電極は $V_0/2$ に荷電され、相対的位置 $R$ にある電極は $-V_0/2$ に荷電される。時間 $t_1$ だけ継続する第3の状態では、電極は電荷が全て除去され、粒子は自由に拡散する。これらの第1及び第3の状態は、前出の節で記述された操作形態の2つの状態と同一である。付加的な第3の中間状態においては、相対的位置 $-R$ 及び $+R$ にある電極は $+V_0/2$ に荷電され、相対的位置 $0$ にある中間電極は $-V_0/2$ に荷電される。こうして、粒子を密に局在化する狭いV字形のポテンシャルウェルが作り出される。

#### 【0153】

これは、いずれかの側に急な壁をもつポテンシャルウェルの底で粒子のためのより強くより狭いトラップを提供することができることから有用なことである。これは、各ポテンシャルサイクル中の各々のウェルの中に、ほとんどない位に薄い好ましい分布により近い密度分布を生成することになる。

#### 【0154】

#### 5.3.5. 他の実施態様：温度ランプ

さらに他の実施態様は、操作中に装置の温度をランプし又は変化させ、好ましくは移動及び分離が起こるときに温度を上昇させることを含む。この態様は、広範囲の拡散係数を有する粒子群を分離するのに有利であり、第5.3.3節に記載した態様と組み合わせて実施することもできる。低温では、分子などの粒子は典型的に低い拡散性を有し（式（27）参照）、また収容する液体は典型的に高い粘性を有するので、より運動性の高い粒子及び分子の移動及び分離はそのような低温で行われる。他方高温では、粒子は典型的に高い拡散性を有し（式（27）参照）、また収容する液体は典型的に低い粘性を有するので、より運動性の低い粒子及び分子の移動及び分離はそのような低温で行われる。本実施態様では、最初の時間間隔では装置の温度は低くして、試料中のより運動性の高い粒子が分離

されるようにし、後に装置の温度を高くして、より運動性の低い粒子が分離されるようにする。

#### 【0155】

さらに詳しくは、温度は2以上のステップによりランプし又は上昇させることができ、また継続的に上昇させることもできる。温度増加分は、より運動性の低い種類の運動性がおよそ1.2、1.5、1.8、2.0又はそれ以上の係数により変化するようにして決定することができる。例えば、一本鎖DNAの分離では、溶媒の融点の丁度上から沸点の丁度下まで温度を上昇させることができる。特に、水溶液又は水溶液に近い溶液では、温度はおよそ4℃からおよそ97℃まで上昇させることができる。このようにして、例えば、試料中の50及び51塩基対のDNA分子を、例えば300及び301塩基対のDNAから分離することができる。温度ランプ又は温度変化は、上記の温度コントロールモジュールによって行うことができる。

#### 【0156】

さらに他の実施態様は、粒子移動速度を決定する他の条件を動的に調整することにより実現される。これらの条件には、傾斜容離又は溶媒プログラミングが含まれる。(D.A.Skoog, f. J.Holler, 及びT.A.Nielman, 1998, Principles of Instrumental Analysis, 5<sup>th</sup> ed., Saunders College Publishing) 一般的に、クロマトグラフィー分離の向上に適用可能な技術は、全て本発明の分離装置に適用可能である。

#### 【0157】

##### 5.3.5. 他の実施態様：電圧ランプ

追加的な他の実施態様は、装置の操作中のポテンシャルのランピング又は変動である。本発明の本態様では、最大の分子フラグメントが追従するには速すぎるが、より小さなフラグメントが追従するには十分なサイクル時間がポテンシャルに用いられる。このような場合、異なる寸法のフラグメントによる電圧ランピングに対する異なる反応の結果として分離が起こる。

#### 【0158】

特に、初めに高いドライブ周波数でポテンシャルを変化させることにより分離



が起こる。この周波数は、最小、最速の粒子の分離を最適化するように初めにセットされる。この周波数は、継続的又は断続的に徐々に低下する。これにより最小のフラグメントはチップの長さを移動し、より大きなフラグメントがこれに続く。同様なサイズを有するフラグメントは同様の電圧変動に反応し、分離が起こる。周波数低下の速度は、分離する種類の拡散速度が与えられれば、所望の分離のために最適化することができる。分離する分子の等方性拡散には信頼性がないが、それでも分離は、寸法及び質量に依存するキャリア流体中の分子速度に基づいている。

#### 【0159】

このアプローチでは、隣接する電極対は互いに接続されていない。むしろ、電圧は進行波中をチップの長さ分スイープされる。より大きくより質量の大きいフラグメントは、より小さくより質量の小さいフラグメントと違い、この波に追従できない。一度より小さなフラグメントがチップの検出領域を出ると、進行波の周波数は低減され、それよりわずかに大きなフラグメントが追従できるようになる。全ての対象フラグメントが検出されるまでこれが繰り返される。

#### 【0160】

例えば、20～200bpの範囲のDNAフラグメントの混合物と、寸法 $r$ が $0.1\mu\text{m}$ 、及びオン状態の電圧ギャップが $0.1\text{V}$ である装置を考えてみる。特定の実施形態において、21merから20merを分離するために、1～10kHz間の周波数とし、最も好ましくは、 $1.5 \times 10^{-4}$ 秒間オン状態、 $2 \times 10^{-5}$ 秒間オフ状態で、及び1.4秒継続する（それぞれ、 $D=8.14 \times 10^{-7}\text{cm}^2/\text{秒}$ 及び $7.91 \times 10^{-7}\text{cm}^2/\text{秒}$ 、を計算に用いた）。

#### 【0161】

最も好ましくは、201merから200merを分離するために、 $5.5 \times 10^{-5}$ 秒間のオン状態にスイッチし、 $6.5 \times 10^{-5}$ 秒間のオフ状態が100秒間継続する。

#### 【0162】

### 5.4. DNA分離への応用

本発明の重要な利用分野は、（生体高分子断片を含む）生体高分子、特にDN

A (例えばcDNA、ゲノムDNA、合成DNA) 及びRNAのような核酸を分離することにある。DNAの拡散率はほぼ全面的にDNA分子内のヌクレオチドの数に左右されることから、この分野における利用が可能になっている。さらに、実質的ではないが、合計塩基組成、すなわちdsDNAについてはA+T対G+Cの比率に対する拡散率の依存性も存在する。

#### 【0163】

必要とされる分離分解能は、DNA分離の利用分野によって異なり、単一塩基対の分解能から合計DNA長の10%以上という大きい分解能にまで至る。例えば、恐らくは比較的親しみのある利用分野であるDNA配列決定のためには、DNAは一般に単一塩基又は塩基対の分解能で分離されなくてはならない。このようにして、標準配列決定反応により生成されたDNAのアリコート (例えばF. Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463; M. Maxam et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560) を、本発明の分離方法に付することが可能である。サイズ評価 (選別) と呼ばれるDNA分離のもう1つの利用分野では、断片長のわずかに±5%又は±10%の分解能が必要とされる。サイズ評価は、RFLP決定、遺伝子型決定、連鎖分析、マイクロサテライト分析及びその他の断片分析の利用分野のために生成されうるようなDNA混合物内のサイズのパターン又は指紋を迅速に生成するために使用される。

#### 【0164】

##### 5.4.1. DNAの拡散率

操作及び装置パラメータの選択のために用いられるssDNA及びdsDNAの拡散定数は、ストークスの法則から推定するか又は実験により得ることができる。ストークスの法則の粒子の拡散定数は次の式から得られる：

【数27】

$$D = k_B T / 6\pi\eta\Gamma, \quad (27)$$

なお式中、Tは温度、 $\eta$ は分離媒質の粘度 (例えば、水については0.01 g m/cm秒)、 $\Gamma$ は有効粒子半径である (Doi et al., 1986, The theory of

Polymer Dynamics, Clarendon Press, Oxford, p 300)。

【0165】

変性 s s DNA といった球形粒子については、 $\Gamma$  は回転半径として識別される。スケーリング論が、重合体様の s s DNA の輪郭長さと回転半径を関係づけている。一般に、指数  $\gamma = 0.6$  として  $\Gamma \sim N$  である (例えば Doi et al. 前出を参照のこと)。d s DNA といったように  $a \gg$  直径  $b$  である長い円筒については  $\Gamma = a / \ln(a/b)$  であることがわかる。N 個の塩基対をもつ d s DNA においては、この近似を伴うストークスの法則の拡散定数は、以下の式から求められる：

【数28】

$$\frac{\ln(a/b) k_B T}{3\pi\eta a} = (1/N) \ln(0.3N) \times 1.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (28)$$

なお式中、直径  $b = 10 \text{ \AA}$  であり、長さ  $a = 3N \text{ \AA}$  である。温度  $T$  は、全体を通して  $298^\circ \text{ K}$  であると仮定される。

【0166】

拡散定数についての実験式が好ましく、以下では全体を通してこれが用いられている。水中室温での d s DNA の拡散率は、以下の式から近似的に、実験により求められる：

【数29】

$$D_{dsDNA} = 1.14 \times 10^{-6} N^{-1} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (29)$$

なお式中、 $N$  は塩基対の数である (Weast, ed., 1987, Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Publishing Co, Boca Raton, FL, p 117)。観察上、 $N$  に対する逆依存性が、式 3.1 中の比較的弱い  $\ln(N)$  項を支配している。s s DNA については、拡散率は、理論的に次の式から得られると仮定される。

【0167】

【数30】

$$D_{ssDNA} = 1.14 \times 10^{-6} N^{-0.59} \text{ cm}^2/\text{s} \quad (30)$$

Nでのスケーリングは、Dが有効半径の逆数により左右されることを予測するストークスの法則から演繹される。有効半径は、ssDNA拡散が、 $N^{0.59}$ といった塩基数により有効半径が左右される自己回避ウォークに似ているとみなすことから演繹される。例えば Doi et al., 前出、を参照のこと。

【0168】

5.4.2  $t_{on}$  及び  $t_{off}$  の最適な選定

最適な  $t_{on}$  の好ましい決定

ポテンシャルウェルの中でDNA断片を誘引するのに必要な時間である  $t_{on}$  は、 $t_{on}$  についての式12又は14とDNAの拡散定数についての式29及び30を組み合わせることによって決定することができる。DNA上の電荷Qは、ssDNAについて  $-N|e|$  及び dsDNAについて  $-2N|e|$  であり、ここでNは塩基又は塩基対の数であり、 $|e|$  は電子の電荷の絶対値である。ボルト単位の  $V_0$  及び  $\mu\text{m}$  単位の  $(L-R)$  を用いて、 $t_{on}$  が以下の式から求められる：

【数31】

$$t_{on} = \frac{(L-R)^2}{(V_0/2)N^{0.41}} \times 1.1 \times 10^{-4} \text{ sec, ssDNA;} \quad (31)$$

【数32】

$$t_{on} = \frac{(L-R)^2}{(V_0/2)} \times 5.6 \times 10^{-5} \text{ sec, dsDNA;} \quad (32)$$

$V_0$  が水の破壊電圧として選択される場合、 $t_{on}$  は、L及びRが  $\mu\text{m}$  単位であるものとして以下の式から得られる：

【数33】

$$\begin{aligned}
 t_{on} &= \frac{(L-R)^2}{RN^{0.41}} \times 2.3 \times 10^{-4} \text{ sec, ssDNA; and} \\
 t_{on} &= \frac{(L-R)^2}{R} \times 10^{-4} \text{ sec, dsDNA,}
 \end{aligned}
 \tag{33}$$

表2は、 $L = 10 \mu\text{m}$ 、 $R = 1 \mu\text{m}$ 及び $V_0 = 1 \text{ V}$ の場合の装置についての秒単位の $t_{on}$ を示す。好ましい、最も高速の分離については、 $t_{on}$ はできるかぎり小さいものとして選択されるべきである。

【0169】

【表2】

フラグメントサイズ	$t_{on}$ for ssDNA (secs)	$t_{on}$ for dsDNA (secs)
10	0.0071	0.0091
100	0.0028	0.0091
500	0.0014	0.0091

時間 $t_{on}$ は、ポテンシャルの空間スケール( $R$ 及び $L$ )と共に線形的にスケールリングする。これは、ssDNA及びdsDNAについての $N$ と共に異なる形でスケールリングする。ssDNAについては、駆動力が分子長と共に線形的に増大するものの拡散率はより低速で減少することから、 $t_{on}$ は分子長の減少関数である。dsDNAについては、分子長に対する駆動力の依存性が断片長に対する拡散率の依存性を正確に取消すことから、 $t_{on}$ は分子長とは無関係である。

【0170】

最適な $t_{off}$ の好ましい決定

好ましくは、最適な $t_{off}$ は、合計分離時間 $T_{tot}$ を最小にするように選定される。 $T_{tot}$ は、 $T_{on}$ についての式19を $N_{off}$ についての式18と組み合わせることによって得られる。

【0171】

【数34】

$$T_{tot} = (t_{on} + t_{off}) \alpha_D (1 - \alpha_D) / (\alpha_D - \alpha_{D, \Delta D})^2.
 \tag{34}$$

$D$ 及び $t_{off}$ に対する $\alpha_D$ の依存性は、式7から得られ、これはここで繰返



して示される。

【0172】

【数35】

$$\alpha_p = \frac{1}{2} \operatorname{erfc} \left( R / \sqrt{4Dt_{\text{off}}} \right) \quad (35)$$

Dは、式32及び33に従って、分離されるべきDNA内の塩基又は塩基対の数であるNによって左右される。

【0173】

$T_{i,j}$  を最小にするため、パラメータ  $t_{i,j}$  は  $T_{i,j}$  について最小値を得るべく系統的に変動させられる。パラメータ  $t_{i,j}$  は、 $T_{i,j}$  を最小にする値となるように最適な形で選定される。

【0174】

これらの関係式、特に式33、34及び35に従って本発明のためのDNA分離のパラメータを計算するためのC言語でのプログラム例が第8節に記述されている。入力には、分離されるべきDNA分子についての長さRとL、長さN及び  $N + \Delta N$ 、そしてssDNAとdsDNA間の選択が含まれる。電圧V0は、水の破壊電界及び水の電解が起こる過剰ポテンシャルと一貫性のある最大値となるように自動的に選定される。プログラムは、その他の分離媒質に適当なこれらのパラメータの値について変更することができる。プログラムは、最適な  $T_{i,j}$  を見い出すため系統的に  $t_{i,j}$  を変動させる。出力には、最適な操作条件  $t_{i,j}$  及び  $t_{i,j}$  及び  $N_{i,j}$  及び  $T_{i,j}$  を含む操作のさらなる詳細が含まれる。出力には同様に、最適値のまわりの範囲内にこれらの数量の値を含有するファイルも含まれている。このプログラムは、C言語コンパイラ及びランタイムシステムを内含するあらゆるコンピュータシステム上でコンパイルし実行することができる。当業者であれば、このプログラムを、その他の類似の言語をもつコンピュータシステム上での実行のためにこのような言語に翻訳することができる。

【0175】

図13は、プログラムを用いた  $t_{i,j}$  の最適な選定の一例を示す。  $T_{i,j}$

は、長さ100のdsDNA分子が水性分離媒質内の長さ105のものから分離されることになる、 $L=10\mu\text{m}$ 及び $R=1\mu\text{m}$ を有するポテンシャルについての $t_{\text{off}}$ を用いて、数値的に評価される。図13は、これら2つの数量の間の関係についての、結果として得られたグラフを示している。図13から、 $t_{\text{off}}$ についての最適な選択が0.10秒であり、これが6.8分の最適な合計分離時間を生み出すということは明白である。

【0176】

表3は、さまざまなDNA分子長及び必要とされる分離分解能についての類似の最適化の結果を提示している。全てのケースにおいて、分離は、 $L=10\mu\text{m}$ 及び $R=1\mu\text{m}$ を有するポテンシャルで、水性媒質中でのものである。

【0177】

【表3】

DNAフラグメント	$T_{\text{tot}}/\text{分}$	$L_{\text{tot}}/\text{cm}$	$t_{\text{off}}/\text{秒}$	$N_{\text{seq}}$	$\alpha_N$
ssDNA					
$N=10, \Delta N=1$	0.48	0.083	0.0053	$2.3 \times 10^3$	0.036
$N=100, \Delta N=1$	71.	4.4	0.015	$2.3 \times 10^5$	0.019
$N=100, \Delta N=10$	0.85	0.057	0.016	$2.7 \times 10^3$	0.021
$N=500, \Delta N=25$	7.0	0.18	0.038	$1.1 \times 10^4$	0.017
$N=500, \Delta N=50$	1.9	0.052	0.039	$2.8 \times 10^3$	0.019
dsDNA					
$N=10, \Delta N=1$	0.32	0.028	0.013	$8.7 \times 10^2$	0.032
$N=100, \Delta N=1$	150	1.48	0.098	$8.5 \times 10^4$	0.017
$N=100, \Delta N=10$	1.9	0.021	0.11	$9.9 \times 10^2$	0.022
$N=500, \Delta N=25$	32.	0.067	0.50	$3.8 \times 10^3$	0.018
$N=500, \Delta N=50$	9.0	0.020	0.52	$1.0 \times 10^3$	0.020

図14は、多数のこのような最適化計算の要約をグラフで示している。グラフの水平軸は、分子長の百分率として表わされた望ましい分離分解能を表している。垂直軸は、分単位の所要合計分離時間 $T_{\text{tot}}$ を表わす。グラフは、ssDNA及びdsDNAについての2つの分子長100及び500に必要なとされる分離時間を示している。ここでもまた、全ての分離は、 $L=10\mu\text{m}$ 及び $R=1\mu\text{m}$ を有するポテンシャルで水性媒質中でのものである。

【0178】

図14から、分離が、1%以下の分解能を必要とする配列決定の場合に比べ、

5～10%の分解能しか必要としないサイズ評価の場合にはるかに高速であるということが明白である。図14から、必要とされる分解能の10という係数での変化が $T_{100}$ の100という係数での変化を導く。例えば、5塩基の分解能(5%)による長さ100の分子の分離は、1塩基の分解能(1%)による長さ100の分子の分離よりも25倍速く実行できる。従って、この装置を用いると、DNAの迅速な配列決定及びきわめて迅速なサイズ評価が可能であるということが明らかにわかる。例えば、分離媒質を変更するか又は温度を上昇させることによって、装置のサイズを削減し拡散率を増大させると、その装置の分離時間は短縮される。

【0179】

#### 5.4.3 ポテンシャルの偏心率

この節では、分離時間が速くなればなるほど偏心率の高いポテンシャルが好ましくなるということの実証例について記述する。10  $\mu\text{m}$ という固定した周期長 $L$ をもつもののポテンシャルウェルと最も近い隣接する最大値の間の距離 $R$ が変動するポテンシャルについて、最適な分離パラメータが計算される。より小さい $R/L$ 比というのは、ポテンシャル最小値が各々のポテンシャルウェルの中により高い偏心率で置かれていることを意味する。表4は、水性媒質内の単一塩基分解能(1%)で長さ100のssDNA断片の分離のために行なわれた計算の結果を示す。全てのケースにおいて、 $V_0 = 2\text{ V}$ が用いられる。

【0180】

【表4】

$R/\mu\text{m}$	$T_{100}/\text{s}$	$L_{100}/\text{cm}$	$t_{100}/\text{s}$	$N_{\text{cyc}}$	$\alpha_V$
2	246.	4.0	0.058	$2.5 \times 10^5$	0.016
1	66.	4.2	0.015	$2.4 \times 10^5$	0.017
0.5	21.	4.9	0.0041	$2.3 \times 10^5$	0.022
0.25	9.5	6.5	0.0012	$2.0 \times 10^5$	0.032

$R/L$ 比が減少するにつれて装置の性能は増大する。すなわち合計分離時間は減少する。

【0181】

#### 5.5. タイプI及びIIの装置のマイクロ製造

本発明の方法に従って作動する装置は、分離の利用分野に適切でしかも前述された最小サイズと一貫性のあるいかなる物理的サイズのものであってもよい。装置が荷電された生体高分子断片をできるかぎり高速で分離するような好ましい実施形態においては、物理的サイズは、一般に製造技術が許容しかつ意図された分離媒質が許すかぎり小さいものであることが好ましい。本節では、約2ボルトの電位差が適用される水性分離媒質に適したタイプI及びIIの装置について、標準的マイクロ製造技術を用いた製造方法の例を紹介する。本発明は、その他の技術に従った製造及びその他の寸法の装置を内含することから、これらの方法は一例にすぎない。

#### 【0182】

タイプI及びIIの装置例のサイズは、分離軸に沿って約1cm～10cmであり、分離軸に対し横方向に約1cm～10cmである。装置内のチャンネルは、幅約30～50 $\mu$ m、深さ10 $\mu$ m、で100 $\mu$ m毎に離隔され、隣接するチャンネル間の離隔距離は約50 $\mu$ mである。各複数セットの中の電極は、約20 $\mu$ m離隔され、すなわち $L=20\mu\text{m}$ であり、幅は約0.8～1 $\mu$ mである。各複数セットの中の電極は、ほぼその幅の分だけ相対的に移動させられる。すなわち $R=0.8\sim1.0\mu\text{m}$ 。各複数セットの中の電極は、外部の電圧源に対するリンクのため装置の縁部で電極パッドに接続されている。

#### 【0183】

記載のある場合を除き、以下のマイクロ製造計画は、両方のタイプの装置に同等に適用される。記述されている方法は、マイクロ製造技術において標準的なものである (Sze, 1988, VLSI Technology, McGraw Hill, New York)

##### 5.5.1. 基板

該装置にとって好ましい基板は、ソーダ石灰ガラスといったようなガラスである。代替的な基板としては、熔融シリカ、ホウケイ酸塩、石英、パイレックス (登録商標) 及びポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリイミドなどといったプラスチックが挙げられる。ガラス基板の寸法は、約1～10cm×1～10cmであり、厚さは1～5mmである。ガラス基板の適切な供給源は、ソーダ石灰ガラスの顕微鏡用スライド、例えば75×50×1mm

のスライドである (Fisher Scientific 社カタログ番号12-550C)。

【0184】

その他全てのマイクロ製造段階に先立ち、基板を清浄しなくてはならない。ガラス基板については、これは $H_2SO_4/H_2O_2$ の熱浴中に基板を浸漬させ、10分間 $H_2O$ 中で洗浄し、再び $H_2O$ で洗浄し、約150℃のオープン中で10分間乾燥して吸着された水を除去することによって行なうことができる。

【0185】

5.5.2. 電極製造

装置のための電極はさまざまな金属から製造することができる。好ましい金属は、Al、Ag、Au及びPtである。容易に利用可能なCMOS鋳造工場を使用できる点でAlが有利であるが、これは、貴金属に比べ電解変質を受けやすいという点で不利である。Ti、Ni、Zn、Ru、Pd、Ta及びWならびにドーパされたポリシリコンを含む他の金属を、装置の電極に用いることができる。これらの金属のための代替的電極製造方法が記述されている：すなわち、エッチングを用いて全ての好ましい金属に適した第1の方法、Ptに適した第1の代替案そしてAuに適した第2の代替案である。

【0186】

第1の方法又は第1の代替的方法を用いた電極製造に先立ち、フォトリソグラフィのためのパターンマスクが製造される。図15は、マスクの一例を例示している。1501、1502、1503及び1504にあるような電極は、分離軸Sに対し実質的に横方向に配置されている。各々の電極は、幅が約1 $\mu m$ である。電極は、2つの複数セットを形成し、各セットの電極は、電極パッド1505及び1506のうちの1つに接続されている。これらのパッドは巨視的規模で約0.1mmであり、外部電圧源に対する接点として役立つ。各複数セットの電極は、距離Lで周期的に間隔どりされ、互いに対し距離Rだけ移動させられている。これらの寸法のマスクが、標準的なマイクロリソグラフィ技術を用いて容易に製作可能である。例えば、石英表面上に被着したクロムを選択的に除去することにより適切なマスクが得られる。クロムは、例えば、パターン生成プログラムのために入力を提供する計算機援用設計を用いて除去される。入手可能である



ならば、より小さな特長サイズが好ましい；ここで用いられるサイズは一例にすぎない。

#### 【0187】

電極を製造するための第1の方法は、電極を支持すべき基板の側面上に選択された金属の均等厚さ $1\mu\text{m}$ の層を被着させることから始まる。金属層はおよそ $100\text{nm}$ からおよそ $1\mu\text{m}$ にすることができ、好ましくは $300\text{nm}$ とする。金属は例えば物理蒸着、化学蒸着又はスパッタリングにより被着させることができる。このとき、金属層の上にポジ型フォトレジストがスピニングされ、ソフトバークにより安定化される。マスク上の特長は、UV光を照射することによりフォトレジストに転写され、光に露呈された無保護領域は適切な溶剤により溶解させられる。存続するフォトレジストは、高温でのハードベキングにより、所定の場所に固定される。

#### 【0188】

電極は、フォトレジストにより保護されていない金属領域をエッチングすることによって生成される。Al電極については、エッチングは、 $\text{Cl}_2$ 蒸気に表面を露呈することによって達成できる。 $\text{Cl}_2$ 分子は表面上のAl原子と反応して $\text{AlCl}_3$ を生成し、この $\text{AlCl}_3$ は、揮発性で表面から離れる。Au及びAg電極については、アンダカットが $\mu\text{m}$ スケールの電極を破壊することになるため、ウェットエッチングは好ましくない。これらの特長は好ましくはAr+イオンミリングを用いてエッチングされる。この方法では、Ar無線周波数プラズマからのAr+イオンが表面内へと加速され、物理的衝撃によるエッチングをひき起こす。ミリングにより、マスク寸法を保つまっすぐな側壁を伴う電極を製造することが可能となる。

#### 【0189】

エッチングの後、残りのフォトレジストは基板の表面から除去され、電極を支持する表面は、その後の処理のため清浄される。

#### 【0190】

Pt電極に適した第1の代替的方法是、標準的なマイクロ機械加工技術を用いる。この方法はまたRu及びPd電極にも適している。製造は、蒸発システムを

用いた厚さ10 nmのTiの被着から始まる。このTi層は、その後のPt層とガラスの間の付着層として作用する。次に、厚さ100 nmのPt層が、Arイオンスパッタリングシステムを用いてTiの上面に被着させられる。電極は、フォトリソグラフィー及びエッチングを用いて金属層の中に構成される。このプロセスは、Ptの上面にフォトレジストをスピコートし、上に電極パターンをもつフォトリソグラフィーマスクを通してUV光にフォトレジストを露呈することから始まる。次に、現像剤の中でフォトレジストの露光部域を溶解させて除去し、電極パターンを構成する未露光領域を残すことができる。フォトレジストは、保持されるべき金属の部域を保護することになる；金属の残りの部分は、イオンミリングを用いて除去される。ミリングプロセスにおいては、正に荷電されたAr<sup>+</sup>イオンが電氣的に加速されて金属の表面に衝突し、層を物理的に腐食する。このエッチングがひとたび完了すると、フォトレジストはアセトンで溶解されて、仕上がった電極を残す。

#### 【0191】

Auに適した第2の代替的方法は、マイクロ密着焼付け法( $\mu$ CP)を用いる(Xia et al., 1995, J. Am. Chem. Soc. 117: 3274-3275; Jackman et al., 1995, Science 269: 664-666)。フォトリソグラフィーマスクの代りに、同じ寸法の同一パターンに従って作られたエラストマスタンプが用いられる。図16A~Bは、パターン例を示す。スタンプはポリジメチルシロキサンから製造できる。前述のものと同様に、Auは、標準的方法を用いて基板の表面上に1  $\mu$ mの厚さに被着させられる。次に、エラストマスタンプはアルカンチオールで湿潤化され、金表面に押しつけられる。適当なアルカンチオールは、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SH}$  (Kumar et al., 1994, Langmuir 10: 1498-1511)である。金表面上のパターン化された自己組立式アルカンチオール単層の制御された展延は、水中での焼付けを行なうことにより達成できるが、これにはさらに、予測可能な形で特長サイズを収縮するという利点がある。スタンプ及び基板は水から除去され、N<sub>2</sub>ガスを用いて乾燥され、次に基板からスタンプが除去される。無保護の金は、酸化剤として空気又は酸素を用いて激しく攪拌しながらシアン化物溶液(0.1 MのKCN, 1 MのKOH)の中に浸漬さ

せることによって除去される (Kumar et al., 前出)。十分にすすいだ後、表面からアルカンチオールを除去して、複数組の金電極を生成する。

【0192】

#### 5.5.3. タイプIの装置のチャンネル製造

タイプIの装置のチャンネルは、ガラス基板をウェットエッチングすることにより製造できる。チャンネル製造に先立って、フォトリソグラフィーマスクを構築しなくてはならない。図16Aは、1つのマスク例を示している。チャンネルは、そうでなければ不透明なマスクの上に、1601及び1602にあるように透明な筋により構成される。各筋の幅Cは、望ましいチャンネル幅から、エッチングプロセス中に予想されるあらゆるアンダカットを差し引いたものである。記述されているプロセスについては、予想アンダカットは8~10 $\mu$ mであることから、幅40 $\mu$ mの筋は、望ましい最終幅が55~60 $\mu$ mのチャンネルを製造する。筋の間の幅Wは、望ましいチャンネル間隔に予想されるあらゆるアンダカットを加えたものである。

【0193】

図16Bは、代替的チャンネル幾何形状を例示している。ここでチャンネル1606といったチャンネルは、全体として1603で表わされている負荷ゾーンの広い間隔から、全体として1605で示されている検出ゾーンの狭い間隔まで収束する。負荷ゾーン1603内の間隔が広いために、チャンネルは、チャンネル間の望ましい間隔よりも大きい直径の1604といった注入ポートを収容することが可能となる。図16Bは、断片状の直線チャンネルを例示しているが、例えば曲線といった代替的なチャンネル幾何形状も本発明に適合させることができる。

【0194】

適当なフォトリソグラフィーマスクは、石英表面上に被着されたクロムを選択的に除去することによって製造可能である。例えばクロムは、パターン生成プログラムへの入力として役立つ計算機生成設計を用いて除去される。

【0195】

チャンネル製造は、ガラス基板上にポジ型フォトレジストをスピコートする

ことから始まる。基板を5分間ヘキサメチルジシラザン蒸気に露呈し、フォトレジストでスピンコートし (Microposit S1400-31, Shipley, Newton, MA)、90℃で0.5時間加熱することによりフォトレジストを安定化させることによって適切なフォトレジスタが生成される。マスクは、コーティングされたガラス基板全体にわたり整列させられ、パターンは、UV光を用いてフォトレジスト上に刻印される。UV光に露呈されたフォトレジストの領域は、溶解され (H<sub>2</sub>Oと Microposit 現像剤濃縮物の1:1混合物, Shipley)、存続するフォトレジストは、150℃で1時間ベーキングすることによって定着させられる。

#### 【0196】

あるいは、チャンネルを、Cr層を用いてガラス基板内に構成することもできる。このプロセスは、ガラス上に厚さ100nmのCr層を蒸発させることで始まる。製造すべきレーン全体にわたるCr層はこのとき、フォトリソグラフィとエッチングを用いて除去される。

#### 【0197】

次に、基板の無保護領域は、水性NH<sub>4</sub>/HFエッチング溶液 (BOE 5:1とBOE 10:1の1:1混合物, J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) にガラスチップの表面を露呈することによってウェットエッチングされる。20分間のエッチングで、深さ10~15nmのチャンネルが製造され、各々の側でフォトレジストが8~10μmずつアンダカットされる。従ってパターン化用マスク上の40μmの特長サイズは、55~60μmという例示的な幅のチャンネルを生成する。エッチングの後、フォトレジスト又はCr層は、例えばガラスの場合、前述のような高温H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いた清浄により、基板から除去される。

#### 【0198】

#### 5.5.4. タイプIIの装置のチャンネル製造

タイプIIの装置のためのチャンネルが、好ましくは、電極の上面に製造される。あるいは、これらのチャンネルはその他の基板の上面に製造することもできる。まず最初に適切なフォトリソグラフィーマスクが製造される。このようなマスクは一般に、次の3つの点を除いてタイプIの装置のチャンネルの場合と類似している。すなわち、第1にこのマスクは、各々のチャンネルの筋を形成する2つ

のチャンネル壁を構成する。第2に、チャンネル壁は透明な筋により構成され、マスクの残りの部分が不透明な状態となる（ネガ型マスク）。第3に、この方法ではいかなるアンダカットも予想されていないことから、マスクの寸法は、意図されたチャンネル及びチャンネル壁の寸法と正確に一致していなくてはならない。

#### 【0199】

その後、チャンネルは、まず最初に約 $10\text{ }\mu\text{m}$ の深さまで基板の表面の上にUV感応性ポリアミド溶液をスピンコートすることによって製造される。ポリアミドはUV光に露呈された領域内で所定の位置にとどまり、そのためフォトリソグラフィーマスクをネガ画像にすることが必要となる。マスクパターンは、UV光を照射することによりポリアミドフォトレジスト上に刻印される。マスクの透明な部分の下ポリアミド層の領域は、UV放射線による架橋によって安定化される。ポリアミド層の残りの部分は、適当な現像剤で溶解される。架橋は、現像及び硬化段階の間、保持されるまっすぐな側壁を形成する。次に、ガラスチップを約 $150^{\circ}\text{C}$ でハードベークしてポリアミド層を硬化させる。こうしてチャンネルのマクロ製造が完了する。

#### 【0200】

##### 5.5.5. 注入ポートの製造

望ましい場合、電極パターンを支持していない基板の中に注入ポートを製造することができる。注入ポート用の穴は、レーザ又はダイヤモンドチップ付きのドリルビットのいずれかで穴あけ加工することによって製造できる。好ましくは、加工穴は、マイクロピペットチップによるサンプルの注入を可能にするようにサイズ決定され、従って $500\text{ }\mu\text{m}$ が適切なサイズである。注入ポートの好ましいサイズは、チャンネル間の好ましい間隔の5～10倍であることから、移動及び検出領域における密に間隔どりされたチャンネルのためには、図16Aのまっすぐなパターンよりも図16Bの収束するチャンネルパターンの方が好ましい。

#### 【0201】

##### 5.5.6. 基板の溶融

装置内に閉じた分離レーンを作り出すため、チャンネルを伴う基板及びその他



の基板を合わせてボンディングしなくてはならない。最初に、両面を徹底的に清浄し、次に接触させる。タイプIの装置については、温度は約500～600℃のアニール温度まで着実に上昇させられ、このアニール温度で数時間保持され表面の良好なボンディングを確実にする。タイプIIの装置については、平坦なシリカプレートが約200℃のより低い温度でチャンネルのポリアミド表面に熔融させられる。

#### 【0202】

##### 5.6. 電極構造の説明

本発明の電極設計の側面の主要な利点は、分離前に実質的に濃縮された荷電粒子を限定領域に集合させる手段を提供できることである。この集合により装置の残部の粒子濃度が低下する。この利点はまた、装置が以下のステップに従い操作されるときに有効となる。すなわち、第一に、荷電粒子を装置に均一に供給し、第二に、装置を密封し、第三に、荷電粒子を前記限定領域にフォーカスし、最後に、分離を起こす。

#### 【0203】

分離装置は、2以上の種類の荷電粒子を保持するための多数の隣接するセルと、各セルからその（右手に）隣接するセルに、セル内の各種類の量のうち種類特異比率（アルファ（種類））分を移動させるメカニズムとからなる。繰り返し操作により、実質的に全種類が左手セルにある初期状態から始まって、種類の移動及び分離が起こり、右側へと移動する。いわゆるファインマン・ラチェット (R. P. Feynman et al., 1996, The Feynman Lectures on Physics, Vol. 1, Assison-Wesley, Reading, MA) はそのような分離装置である。ある種類のセル単位の濃度は、種類の分離中に大幅に減少し、元の濃度分が多くセルに分配されることが知られている。

#### 【0204】

ファインマン・ラチェットの操作の基本原理は、多数の荷電粒子の拡散性の違いに基づいている。周期的だが空間的に非対称な電気ポテンシャルが装置内に形成される。ポテンシャルがオンになると、粒子は自由に拡散する。速く拡散する粒子は次の“オン”期間中に隣接するポテンシャルウェルに移動する一方で、低

拡散性の粒子はほぼ動かない。このようにして分離が起こる。Bier及びAstumian (M. Bier and R. D. Astumian, 1966, Bioelectrochem. Bioenerg. 39:67; 1996, Phys. Rev. Lett. 76:4277) は、互い噛み合わされ、簡単な方法で電圧源に接続された電極がほぼ線形状に配列された、そのような装置の簡単な実施例を示している。必要なものは、セル間の拡散プロセス、セル間の移動プロセス、及び移動フォーカス（拡散中心）とセル境界のオフセット又は非対称のみである。本発明の装置の機能の詳細は、これを参照することにより理解できるだろう。

#### 【0205】

本発明は、ファインマンラチェットの改良版を提供する。本明細書に開示されている設計の一つの利点は、多数のセルにわたって分配される分離種類が異なる種類ごとに異なるポイントに再フォーカスされることである。このため、多数のセルにわたって分配された弱いシグナルのようなものを、種類に依存して決まる個所の少数のセルに局部的に集め、強いシグナルとすることによりこれらの種類の検出能を非常に高める。図20aおよび図20b（および22も）は濃縮したものにおける再フォーカス効果の図解的描写およびそのような再フォーカスを達成する装置設計を提示する。

#### 【0206】

また、この再フォーカス能により、該装置のサイズ分画への有用性が高まる。そのような再フォーカスは、例えば、一体的な液相サイズ分離／ハイブリダイゼーションチップにおけるハイブリダイゼーション前に、装置をハイブリダイゼーションプローブのサイズ分画に使用するのに（例えば、100～500塩基範囲のみのハイブリダイゼーション結果を見たい場合）好適であろう。

#### 【0207】

本発明の別の利点は、電極設計が検出対象を分離チャンネルの中央線に連続的に向けることができることである（このことは、先行技術においては、ファインマンラチェット効果を高めるための電気ポテンシャルの使用以外の場合に限って知られていた。このことは、装置の光学的バージョン（A. Ashkin, 1970, Phys. Rev. Lett. 24:156; A. Ashkin, 1986, Optics Lett. 11:288; L. P. Faucheux, 1995, Phys. Rev. Lett. 74:1504）および電気分極バージョン（D. Long ら, 1996, Phys

. Rev. Lett. 76:3858; J. Rousselet ら、1994, Nature 370:446) の両方について記載されている)。

#### 【0208】

本発明の設計の他の利点は、電解質と接触している物質が全ての分離チャンネルを通じて実質的に同一であり得ること、および荷電粒子および電極間の接触を最小にし得ることである。ある程度荷電された粒子（例えば、DNA）は分離チャンネル内の表面との化学的相互作用を受けやすい。従って、荷電粒子—電極の相互作用を最小にすることが強く望ましい。本設計はこれを達成する。

#### 【0209】

更なる利点は、本発明で提示された設計の一つの具体例において、電極は互いに噛み合わないので、小電極の特別なサイズについても、装置の組み立ては、近接した電極との間の短い回路に起因して、低い歩留まりで妨げられてしまうことはない。

#### 【0210】

本発明は、ファインマンラチェットメカニズムによるDNAの移動を起こすのに利用できる。本発明の装置は、ファインマンラチェットを利用した全ての様式の分離および動きを増大させるという用途を有する。該装置は、検出能を増大させるのに用いることができる。該装置は、サイズ分画および回収に用いることができる（DNAハイブリダイゼーションのような他の解析技術に先立っても、また他の解析技術中においても、および他の解析技術自体のものとしても）。設計は上述の光学的ファインマンラチェット設計に変えてもよい、また任意にホログラフ回折格子を用いて、光学的ピンセット（optical tweezers）となる光のパターンを生起することができる。

#### 【0211】

図18に示す本発明のファインマンラチェット装置の態様は、“クワッド対称（四方対称）”装置あるいは電極と呼ばれている。直線状の互いに噛み合った電極120が用いられる。それらは、少なくとも4個の結合パッドに接続されている。結合パッドは、十字状に（例えば、右上および右下が正、右上と左下が負）電気線や電気プローブを通してスイッチ能力を有する電圧供給器に接続されている。

。結合パッドの間には中央フォーカスギャップ110がある。電極パターンは、水晶あるいは酸化ケイ素のような基板に接着させるために、チタン粘着層を有する白金で構築されうる。微小製造の標準的技術を用いて、電極幅に合わせて、1から100ミクロンのサイズ幅で所望の電極パターンを達成しうる。

#### 【0212】

一般性を失うことなく、前記装置の操作の好ましい態様は、負に荷電したDNA分析対象の場合のための実施例によって説明される。装置は最初に清掃されるか分析対象の装置への接着防止の処理をされる (S. Henck, 米国特許出願番号60/067,387、1997年12月3日出願、参照として本明細書中に援用する)。少量の希釈DNA溶液 (例えば、 $4\text{pmol}/\mu\text{l}$  の濃度で  $2\mu\text{l}$ ) を装置の表面に添加する。次に、カバースリップを用いて、深さ約10ミクロン以下の液層を作る。紫外線治療接着剤のような封印組成物を、カバースリップの全ての端に添加する。次に、装置は通常の方法で操作され、上述のように接続され、ほとんど全てのDNAを中央電極に集める (装置へのポテンシャルの周期的負荷により、ゼロ以外のバイアスは結果として中央フォーカスギャップ110へのDNAのより急速な集中をもたらす)。結局、電圧供給器が右上、左下のボンドパッドに正電圧を供給するように切り替わるとき、分離が生じる。つまり、分離は通常ファインマンラチェットメカニズム (周期的ポテンシャルに対しゼロバイアス) により生じる。分離された種類は蛍光顕微鏡のような標準的光学手法により検出される。

#### 【0213】

“クワッド対象”電極設計に関連した光学パターンはハイパワーレーザー、ビーム拡散と収束レンズ、ホログラフィー回折エレメント及び当前記分野で知られている他の光学コンポーネントを用いて構成することができる。分離を達成するためにそのようなパターンを用いることが、A. Ashkin, 1970, Phys. Rev. Lett. 24:156; A. Ashkin, 1986, Optics Lett. 11:288; 及び L. P. Faucheeux, 1995, Phys. Rev. Lett. 74:1504に記載されている。

#### 【0214】

別の電極の設計を図19に例示する。該設計は4個の対称的な設計と類似しており、前述の通り、中心フォーカスギャップ110、電極120および結合パッ



ド130を有する。この場合、前記電極は前記装置の対角線に沿って直角を含む。この直角は、荷電粒子が前記装置の上部左側のコーナー方向へ移動し始めるように対角線からわずかに離れて配置された荷電粒子を対角線方向へ移動させるという方法で前記装置を介してポテンシャルを変動させる。その利点は、DNAが分離工程中ずっとセンターラインに沿って凝縮され、それにより分離後の検出が容易になるということである。示した設計は直線マスク設計を用いて製造することができる（角は広範なマスクワークを要する）。電極のマスクパターンにおいて角度を変えることにより、図22に示したものと同様の効果を得ることが出来る。

#### 【0215】

上述したように、サンプルを分離後容易に検出できることが望ましく、また分割後にサンプルを回収することが望ましい。図20aに示す装置はかかる検出および回収を容易にするものである。分離セクション330中に、上記したようにサンプルを負荷し、分離する。電圧供給源から適切な電圧を使用し、且つコントローラ310を、電導線320を介して別の結合パッド130に（前記装置の各側面上に最小5で）スイッチングすることにより、サンプルは再フォーカスセクション340および350へと更に移動する。例えばサンプル中に2種のものが存在している場合は、適切な設計パラメーターを用いて、それらの種が実質的に分離され、各々が前記2つの再フォーカスセクションの一方に見出される時に最終段階に達する。次に、前記コントローラを切り替えて、前記再フォーカスセクション各々それ自体が4個の対称的な装置として機能するようにする。これにより、分離したサンプルが、各再フォーカスセクション340、350内に存在する中心フォーカスギャップ110中の別個のセクション内に蓄積される。操作の原理を図20bに示す。上記したとおりに負荷、密封およびフォーカスすると、前記装置の左側に2種類それぞれの蓄積が見られ、その濃度は曲線380によって示される。分離した後、曲線384および388で示されるように、最初の濃縮物は前記装置の多くの細胞に各細胞当たり低濃度で分配される。各々の種は実質的にその関係する再フォーカスセクション340、350内に残留する。電圧コントローラを切り替えた後、曲線392および396で示されるように、各種



を別個の領域に高濃度で再フォーカスさせる。元のサンプルから分離し濃縮したこれらのフラクションは容易に検出することができ、あるいは更なる用途および分析の為に前記装置から取り出すことができる。

#### 【0216】

上に詳細に記載した装置の設計図においては、電極と検出対象との実質的接触が存在する。この接触は該装置をうまく使用する上で重要であると考えられている。しかし、検出対象と分離チャンネルとの表面相互作用をコントロールすることが好ましい。これらのことを考慮して、設計は、電極と検出対象との接触を最小限に抑えた図21に示したものとなる。好適な材料でできた基礎基盤410を選択し、加工または微細加工し、検出対象に対して適した表面特性を有するように処理する（石英はDNA分析のためにRCAクリーンで処理する。S. Henck, U. S. Patent Application Ser. No. 60/067,387, 1997年12月3日出願を参照されたい。該出願は参照によりその全文を本明細書に組み入れるものとする）。オキシサイドコーティングまたはその他のコーティングを有するSiウェーハ420および430ならびにPt電極は上述のように加工する。該ウェーハは、透視図に示すように、適所に結合する。最後に、好適な材料でできたカバー440は分離チャンネルを含むように加工し、処理、洗浄し、取り付けて該装置を密封する。チャンネル450の幅は、露出した基礎基盤よりわずかに大きく、チャンネルがウェーハ470のエッジと重なるようにする。結果として、小さな電極-試料接触エリア460ができる。これは図21に示した上面図および詳細図から明らかである。装置の装着および作動は上述と同様である。この設計において、特徴的な電極の小サイズのために、装置の作製が、隣接する電極間の短絡による歩留まりの低下に妨げられないように、電極は交互嵌合しないよう、注意しなければならない。

#### 【0217】

上述の図18～20に関して記載した利点を組み合わせて、電極設計の好ましい実施形態を図22に示し、以下にその詳細を説明する。

#### 【0218】

好ましい実施形態の例は、図22に上面図として示す。短い電極セグメントは分離セクション330に隣接し、フォーカスギャップ110と一緒にフォーカスセクシ

ョン500を形成し、該装置のロードおよび密封に続いて、試料はまず濃縮される。電圧の供給およびコントロールユニット310のスイッチングを利用して、試料が電気リードを介して経験する電位を変化させる。これは、試料が分離セクション330を横切るときに、その構成種に分離されるような方法で実施する。試料は、分離セクションの末端（示したように、右側）を離れ、いくつかの再フォーカスセクション（図に5つを示す）520上へ移動する。理想的には、再フォーカスセクションの数は実質的に、もとの試料に含まれると予想される異なる種の数、または分別の望まれるサイズ範囲の数に対応する。マイクロ素子製造の技術を用いて、これを100程度にできる。

#### 【0219】

4対称電極設計は、中央フォーカスギャップ110付近の電極構造の詳細に従って、いくつかの実施形態が可能である。結合パッド130は、典型的には、例えば図18に示すように、交差配線（例えば、左上および右下が正極）する。この図において、中央電極ギャップは上部に接地電極を示し、下部に正極を示す。代替の実施形態においては、単電極を該装置の上半分の下部から取り除くか、単電極を該装置の下半分の上部から取り除くか、または両方を取り除く。これは、接近して配置された電極ペアまたは単一電極により中央電極ギャップが結合されるかどうかに影響を及ぼすことにより、または検出対象がギャップ110に向けてフォーカスしているときに中央の大部分の電極上に見られることになる電荷を変化させることにより、装置の性質を変化させる。好ましい実施形態において、例えば、負に荷電した検出対象（DNA）の場合には、該装置の下半分からの上部電極を除去する。ギャップ110へ向けて検出対象がフォーカスする間、装置の中央は、負に荷電した2つの単一の（ペアでない）電極に囲まれた、正に荷電した電極を含むことになる。これは、負に荷電した検出対象の中央ギャップ110への最良のフォーカスを達成するために好ましい。

#### 【0220】

##### 【実施例】

##### 6. 実施例

##### 6.1. 一本鎖DNAの分離

第5.3節に記述されている本発明の好ましいモデルを用いて、分離装置の挙動を計算する。以下の装置設計パラメータを仮定する： $L = 10 \mu\text{m}$ 、 $R = 1 \mu\text{m}$ 、長さ1 cm、電位差1 V及び水性分離媒質。100塩基ssDNAを分離する上で2塩基分解能を提供するため最適なものとして、 $t_{on} = 1 \text{ msec}$ 及び $t_{off} = 60 \text{ msec}$ を計算する。合計分離時間は60分である。これらの設計及び操作パラメータを用いて、長さ10、20、30、40、50、60、70、80、90及び100のssDNA断片の混合物について（Research Genetics, Huntsville, Al から入手可能な標準的10塩基配列決定用梯子として知られている）、装置の挙動を計算する。

#### 【0221】

図17は、装置の予測される挙動を例示している。水平軸は、増大する合計分離時間を記録し、垂直軸は、装置から退出するDNAの濃度を記録している。このグラフは、分離時間の関数として、装置から退出するDNAの予測された濃度を例示している。DNA断片が全て明確に分離可能でなくてはならないということは明白である。

#### 【0222】

### 7. 特定の実施形態、参考文献の引用

本発明は、本明細書に記述した特定の実施形態により範囲が制限されるべきものではない。実際、本明細書に説明されているものに加えて、以上の説明及び添付図面から、当業者には本発明のさまざまな修正が明らかになることだろう。このような修正は、添付のクレームの範囲内に入るものと意図されている。

#### 【0223】

本明細書にはさまざまな刊行物が引用されており、その開示は全体が参考として内含されるものである。

#### 【0224】

### 8. 最適のパラメータを選択するためのコンピュータプログラム

```

/*
    calculate parameters for the dna separation device
    Copyright 1996 Curagen Corporation
*/

#include    <math.h>
#include    <stdio.h>
#include    <string.h>
#include    <stdlib.h>

#define ABS(x) ((x)>0?(x):(-(x)))

#define PI 3.141592653589793 /* why not? */
#define EBREAK 1.e4 /* breakdown field for water */

#define MINLOG -6.
#define MAXLOG 1.

/* erfc by polynomial approximation */
#define A1 0.2548296
#define A2 -0.28449674
#define A3 1.4214137
#define A4 -1.453152
#define A5 1.0614054
#define QP 0.3275911
#define
    ERFC(x) (((((A5*(1/(1+QP*x))+A4)*(1/(1+QP*x))+A3)*\
(1/(1+QP*x))+A2)*(1/(1+QP*x))+A1)*(1/(1+QP*x))*exp(-x*x))

double R,L; /* R is the small spacing, L is the well spacing*/

double alphafn(double d, double t)
{
    double alpha,x;
    x = R sqrt(4. * d * t);
    alpha 0.5 * ERFC(x);
    return(alpha);
}

main()
{
    double n,dn; /* n and delta n */
    int nstrand; /* 1 for ssDNA, 2 for dsDNA */

```

```

double d,d1; /* diffusivity for length n and (n + dn) */
double logt,t,alpha,alpha1,dadn,dndasq,cycles,time;
double tbest, timebest,t_on,vO;
int ntmp;
double dtmp;

char line[100];

char *datafile = "data";
FILE *fp;

R = 1.;
L = 10.;

printf("Enter R (smaller spacing) and L (larger spacing) in microns: ");
fgets(line,sizeof(line),stdin);
sscanf(line,"%lf %lf",&R,&L);

R *= 1.e-4; /* convert to cm */
L *= 1.e-4;
printf("Device size: R = %lf microns, L = %lf microns\n",
R*1.e4,L*1.e4);

/*
the breakdown field of water is 1e4 V/cm
choose VO so 2VO/r = 1e4 V/cm
*/
vO = R * EBREAK / 2.;
/*
use a maximum overpotential of 2VO = 1 V to avoid electrolysis
8/
if (vO > 0.5) { vO = 0.5;

printf("V_O = %lf V, generating maximum field of %lf V/cm\n",
vO,2.*vO/R);

printf("N = the length of the sequence\n"
"Delta N = the resolution (1 for sequencing)\n")

while (1) {

printf("Enter N and Delta N: ");
fgets(line,sizeof(line),stdin);
sscanf(line,"%lf %lf",&n,&dn);
if (n < 1) { break; }
printf("Enter 1 for ssDNA or 2 for dsDNA: "); fgets(line,sizeof(line),stdin);
sscanf(line,"%d",&nstrand);
if ((nstrand!=1)&&(nstrand!=2)) { break; }
fp = fopen(datafile,"w");

/* determine the diffusion constants for n and n+1 units are cm-2/sec
t-on is the relaxation time for a 200 V potential
*/
if (nstrand == 1) {
t_on = (L-R)*(L-R)*2.24e-4/(R*pow((double)n,0.41));

```



```

t_on *= 1.e4; /* convert from cm to microns */
}
else {
t_on (L-R)*(L-R)*1.12e-4/R;
t_on 1.e4; /* convert from cm to microns */
}
printf("t-on + %lf s\n", t_on);
if (nstrand == 1) {
d = 1.14e-6 * pow(n, -0.59);
dl = 1.14e-6 * pow(n+dn, -0.59);
}
else {
d = 1.14e-6 / n;
dl = 1.14e-6 (n+dn);
}

tbest = 0.; timebest = 1.e100;
for (logt = MINLOG; logt <= MAXLOG; logt += 0.001) {
t = pow(10., logt);
alpha = alphafn(d, t);
alpha1 = alphafn(dl, t);
dadn = alpha1 - alpha;
if (ABS(dadn) < 1.e-6) {continue;}
dndasq = 1. / (dadn * dadn);
cycles = alpha * (1. - alpha) * dndasq;
time = cycles * (t + t_on);
fprintf(fp, "%lf %lf %lf %lf %lf %15.10lf\n",
t, time/60., cycles, alpha, dndasq, dadn);
if (time < timebest) { tbest = t; timebest = time; }
if (time > 10.*timebest) {break;}
}
fclose(fp);

t = tbest;
alpha = alphafn(d, t);
alpha1 = alphafn(dl, t);
dadn = alpha1 - alpha;
dndasq = 1. / (dadn * dadn);
cycles = alpha * (1. - alpha) * dndasq;
time = cycles * (t + t_on);
printf(" N %d Delta %d nstrand %d R (um) %lf L (um) %lf\n",
(int)n, (int)dn, nstrand, 1.e4*R, 1.e4*L);
printf(" t_on %g vO %g\n", t_on, vO);
printf("\nN = %d +/- %d\n",
time (min) %lf\n
length (cm) %lf\n
t_off(sec) %lf\n
N_cyc %f\n
alpha %lf\n\n",
(int)n, (int)dn,
time/60., alpha*cycles*L, t, cycles, alpha);

printf("%lf %lf\n", 1.e4*L, alpha*cycles*L);
printf("%lf %lf\n", t+t-on, time/60.);
for (ntmp = 10; ntmp <= 100; ntmp += 10) {

```

```
    dtmp = 1.14e-6 * pow(ntmp, -0.59);  
    printf("%d %lf\n", ntmp, alphafn(dtmp, t));  
}  
  
printf("End of program.\n");  
}
```

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明による分離器具を示す。

【図2】 図1の分離器具のI型の具体例の1つの分解図を示す。

【図3】 図2の器具の分離方向に対して直交する断面図を示す。

【図4】 図4A及び4Bは図2の器具の電極の詳細、及びこの電極によって発生される電位を示す。

【図5】 図2の器具の分離方向に沿った断面図を示す。

【図6】 図2の器具のローディング部を示す。

【図7】 図1の分離器具のII型の具体例の1つの分解図を示す。

【図8】 図7の器具の分離方向に対して直交する断面図を示す。

【図9】 図9Aないし9Eは本発明の方法の操作を要約して示す。

【図10】 図9Aないし9Eの方法において使用するのに適合し得る電位の形態を示す。

【図11】 図11Aないし11Dは図9Aないし9Eの方法における隣接する2つのポテンシャルウェル中の粒子濃度プロファイルの挙動の詳細を示す。

【図12】 図12Aないし12Eは図9Aないし9Eの方法における隣接する複数のポテンシャルウェル中の詳細な粒子濃度プロファイルの挙動を示す。

【図13】 図9Aないし9Eの方法の操作パラメータを選択するための好ましい方法に関する $t_{0.1}$ 対 $T_{0.1}$ の挙動を示す。

【図14】 図9Aないし9Eの方法の操作パラメータを選択するための好ましい方法にしたがって方法を操作するパラメータが選択されたときの、DNA分子の分離分割の百分率対 $T_{0.1}$ の挙動を示す。

【図15】 図2の器具のための電極を製造するための代表的な写真平板マスクを示す。

【図16】図16Aないし16Bは図2の器具用のチャンネルを製造するための代表的な写真平板マスクを示すそして、

【図17】図9Aないし9Eの方法にしたがったDNA分子の仮想上の分離の例を示す。

【図18】中央フォーカスギャップ及びクワッド対称に噛み合わされた電極の配列を示す。

【図19】分析対象が装置の対角センターラインに継続的に送り込まれるクワッド対称設計を示す。

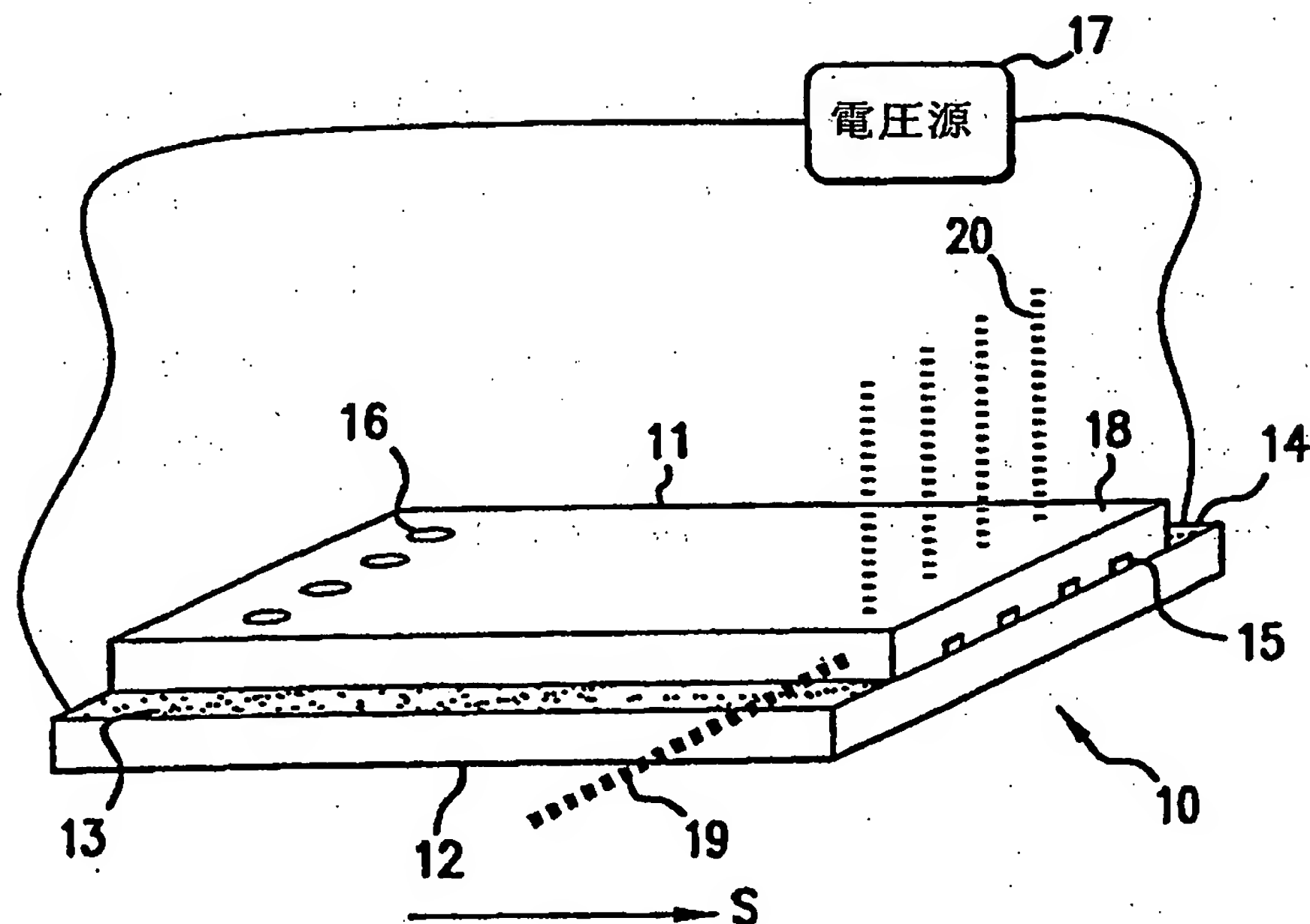
【図20】図20Aは分離後試料の再フォーカスに用いる分離電極セクションの設計概念を示す。

図20Bは図20Aに示した電極設計による検出の利点を示す。

【図21】分離チャンネル壁が全て同様の材料からなり、電極と検出対称の接触が最小である、本発明の装置の実施形態を示す。

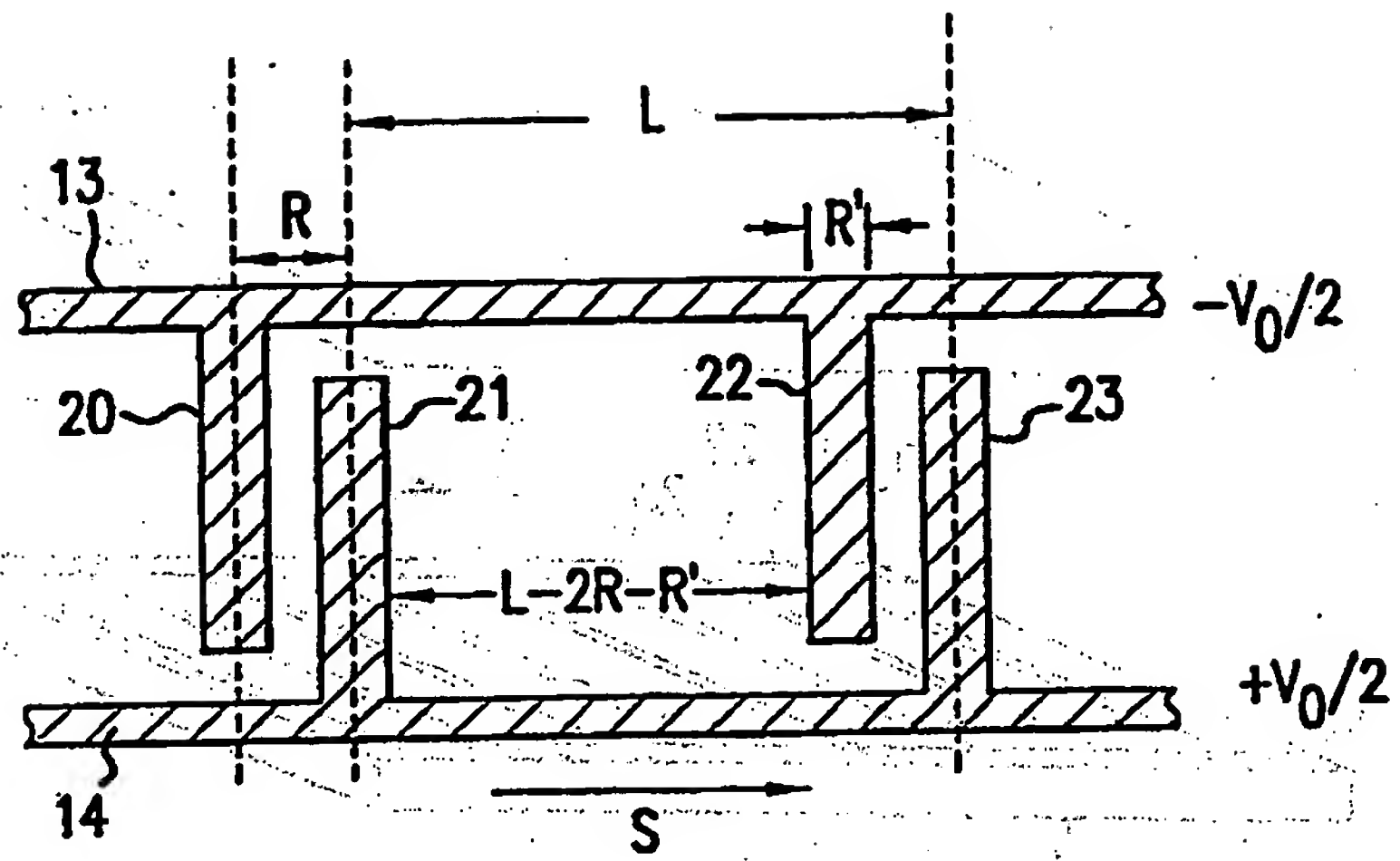
【図22】図18ないし図20に示した利点を含んだ、本発明の装置の好ましい実施形態を示す。

【図1】

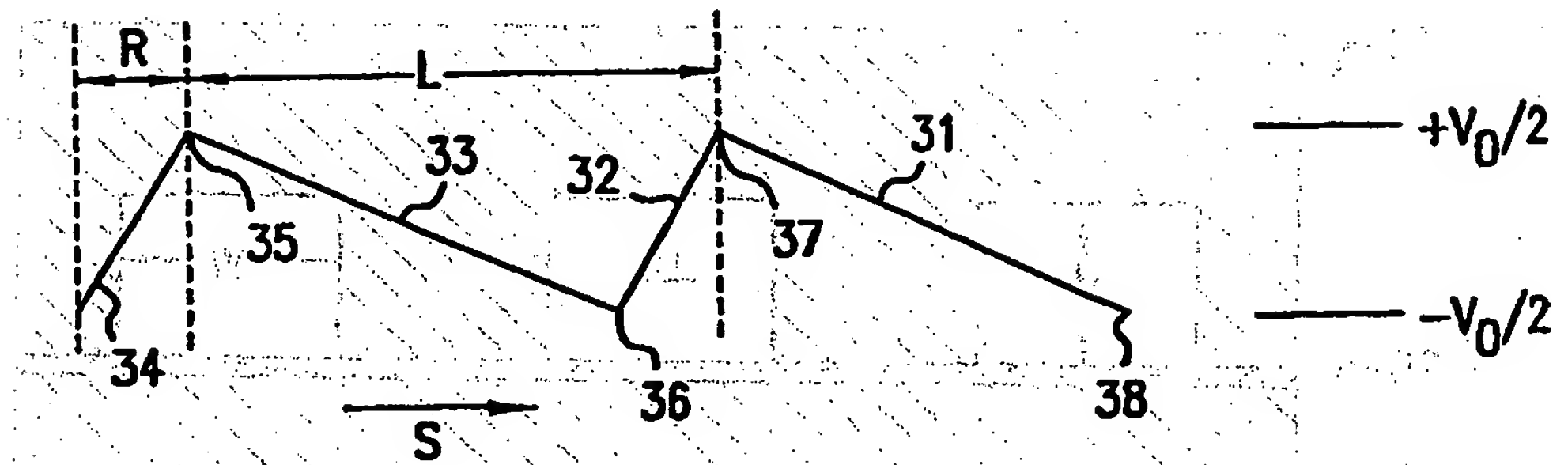


A cross-sectional view of a semiconductor device. A substrate 11 is shown at the top, with diagonal hatching. Below it is a layer 20, also with diagonal hatching. At the bottom is a region 12, with diagonal hatching. Three rectangular blocks are shown on layer 20. The first block on the left has a height H indicated by a vertical double-headed arrow. The middle block is labeled 15. The third block on the right has a width W indicated by a horizontal double-headed arrow.

【図4】



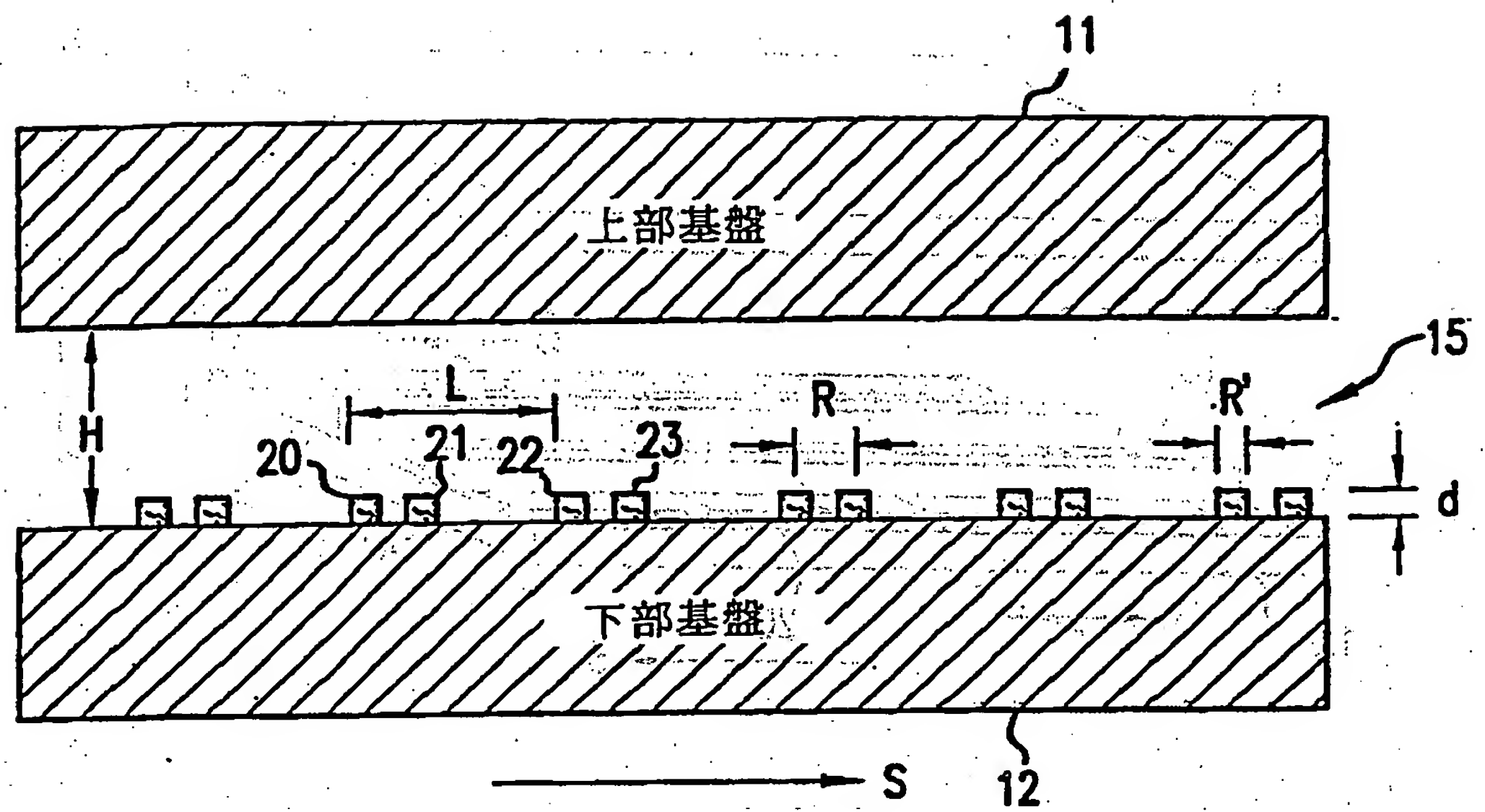
4A



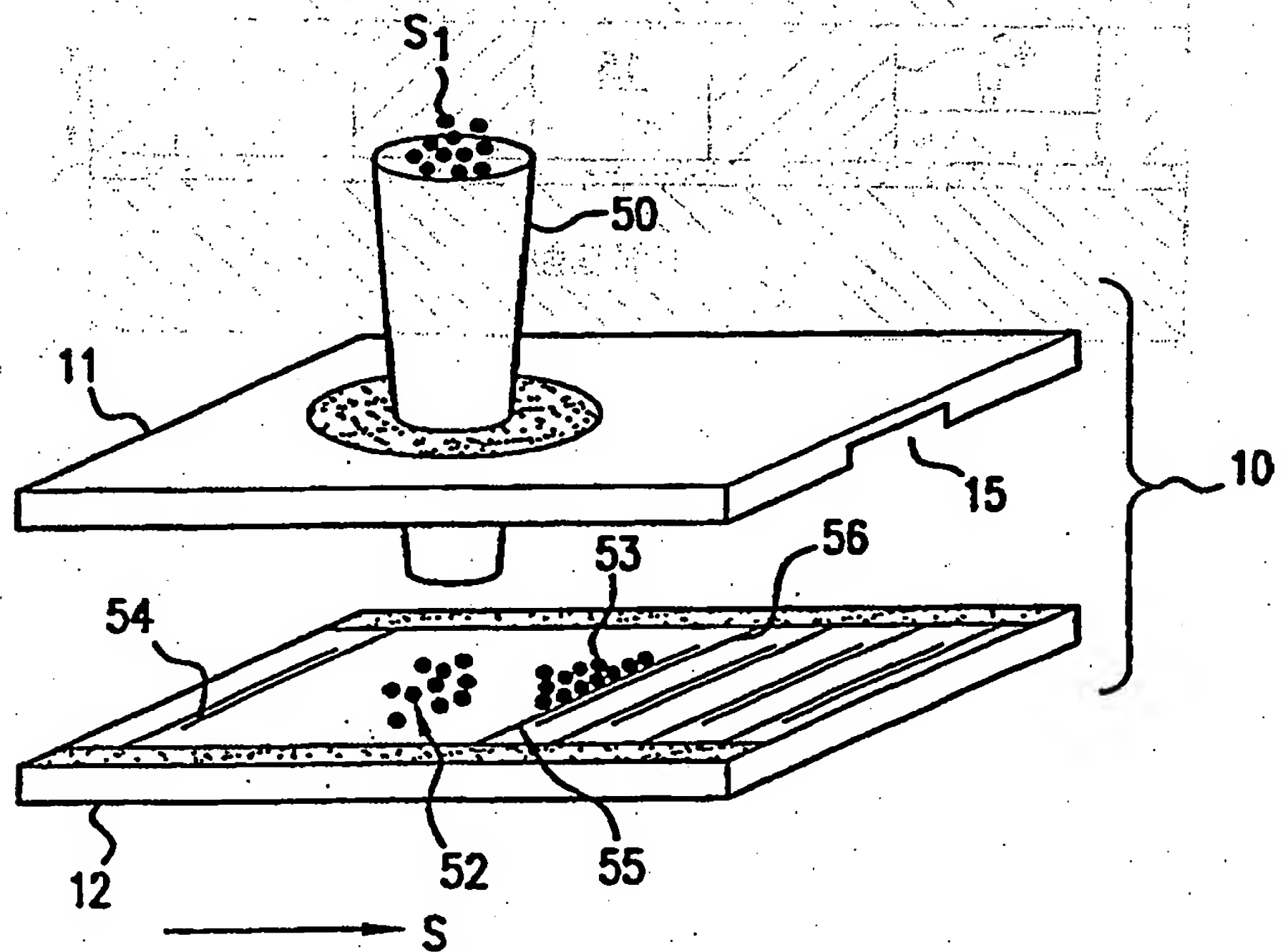
4B



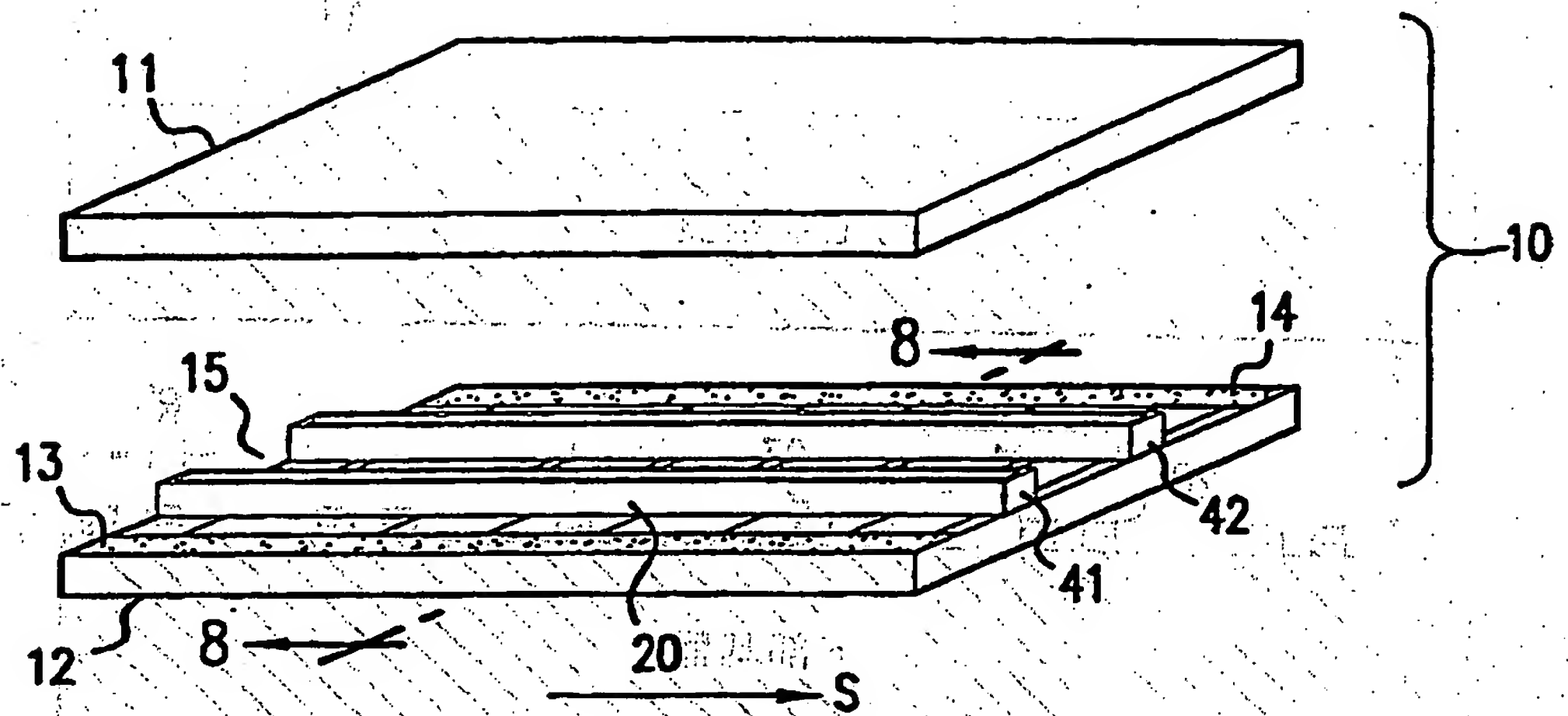
【図 5】



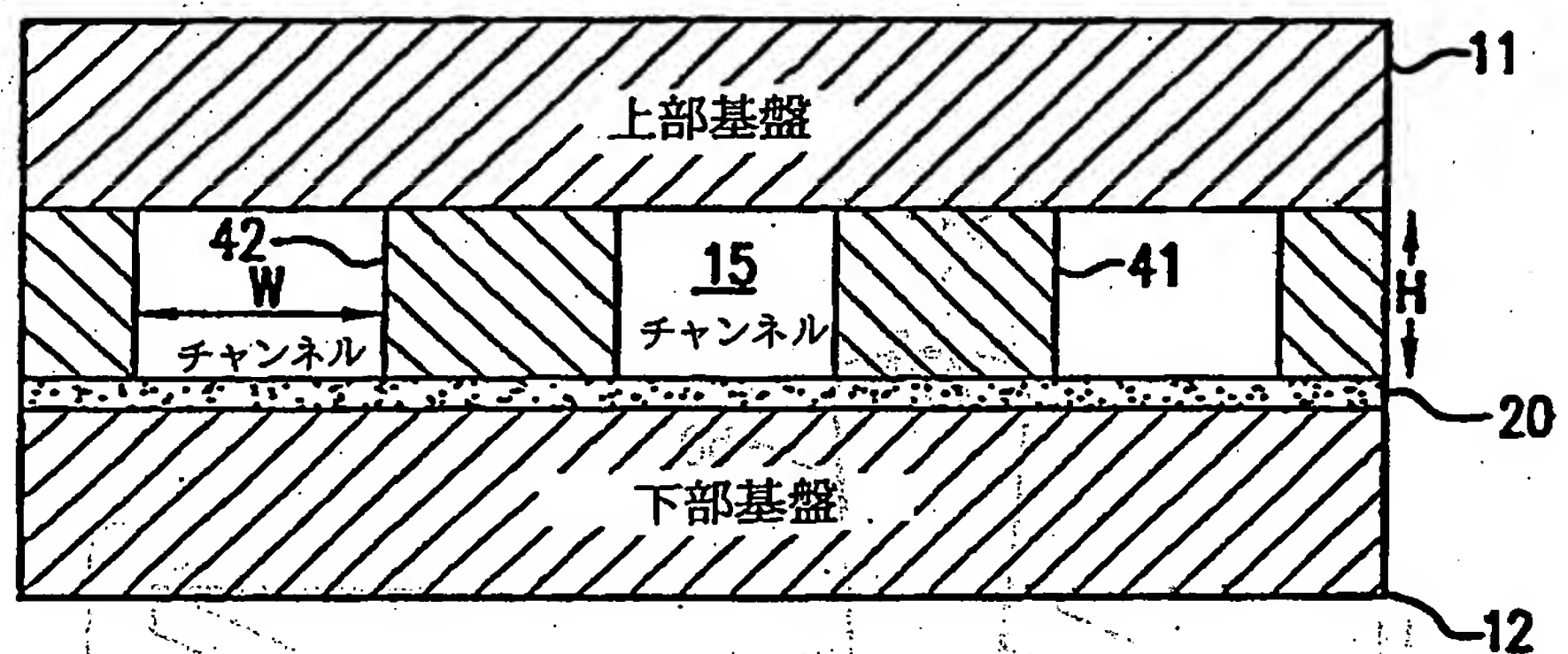
【図 6】



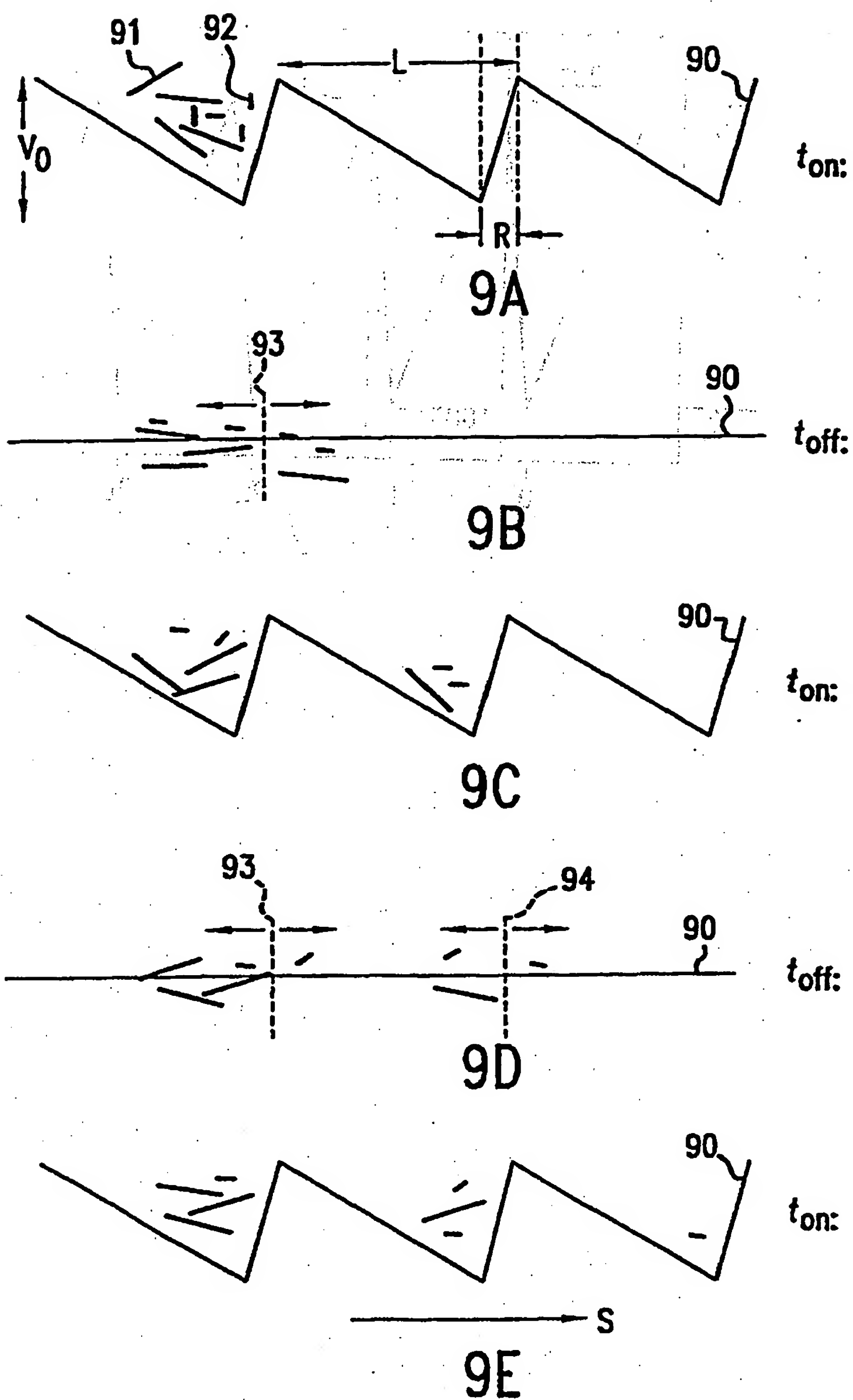
【図7】



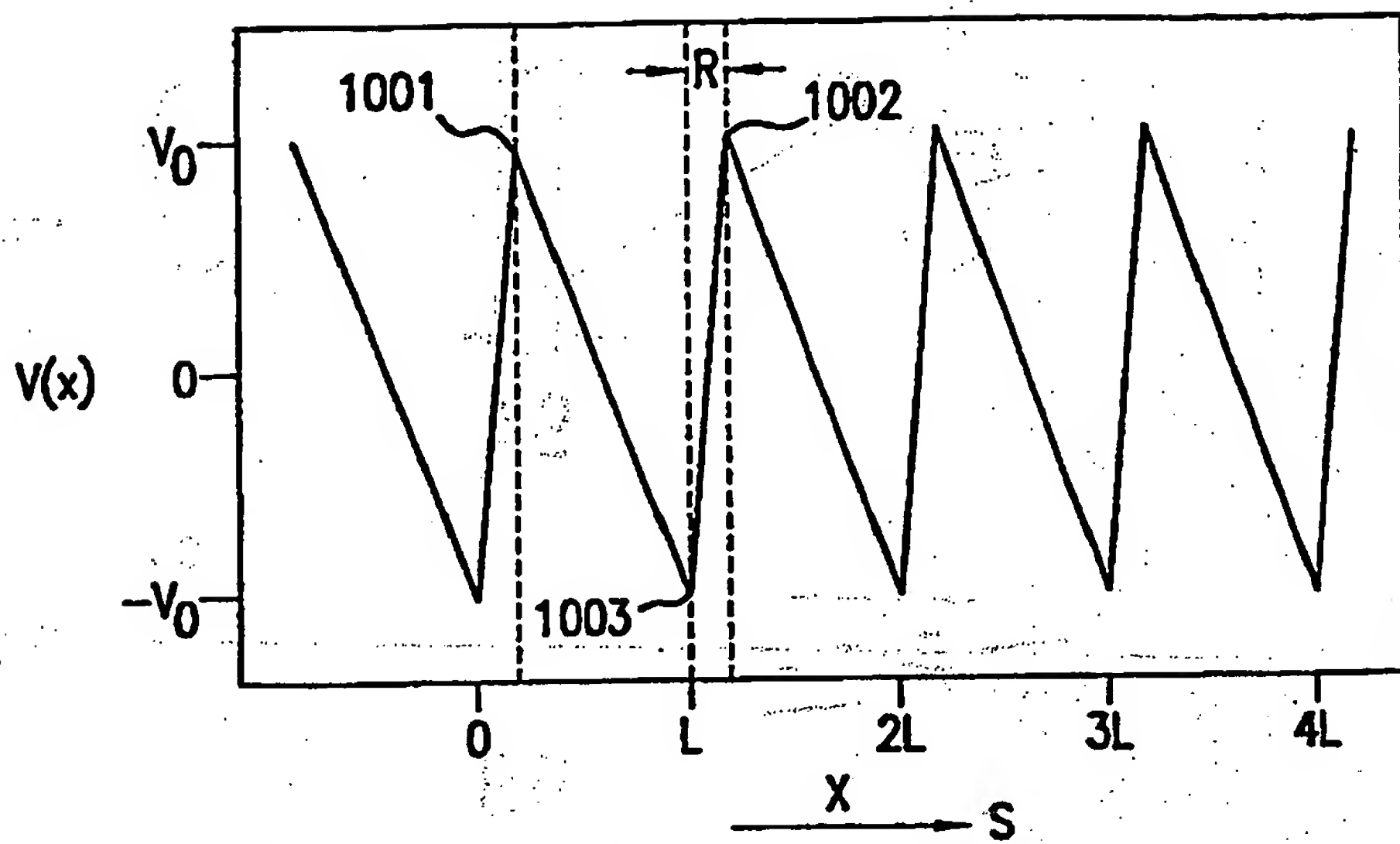
【図8】



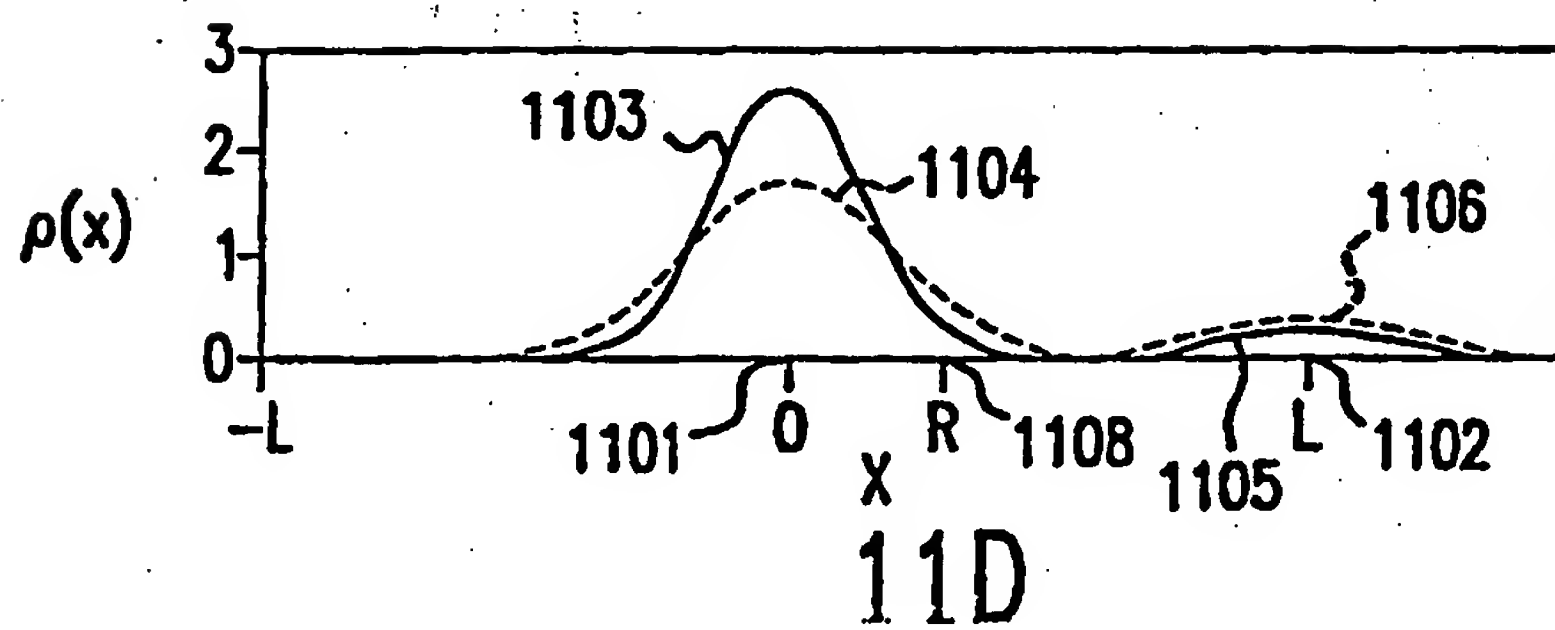
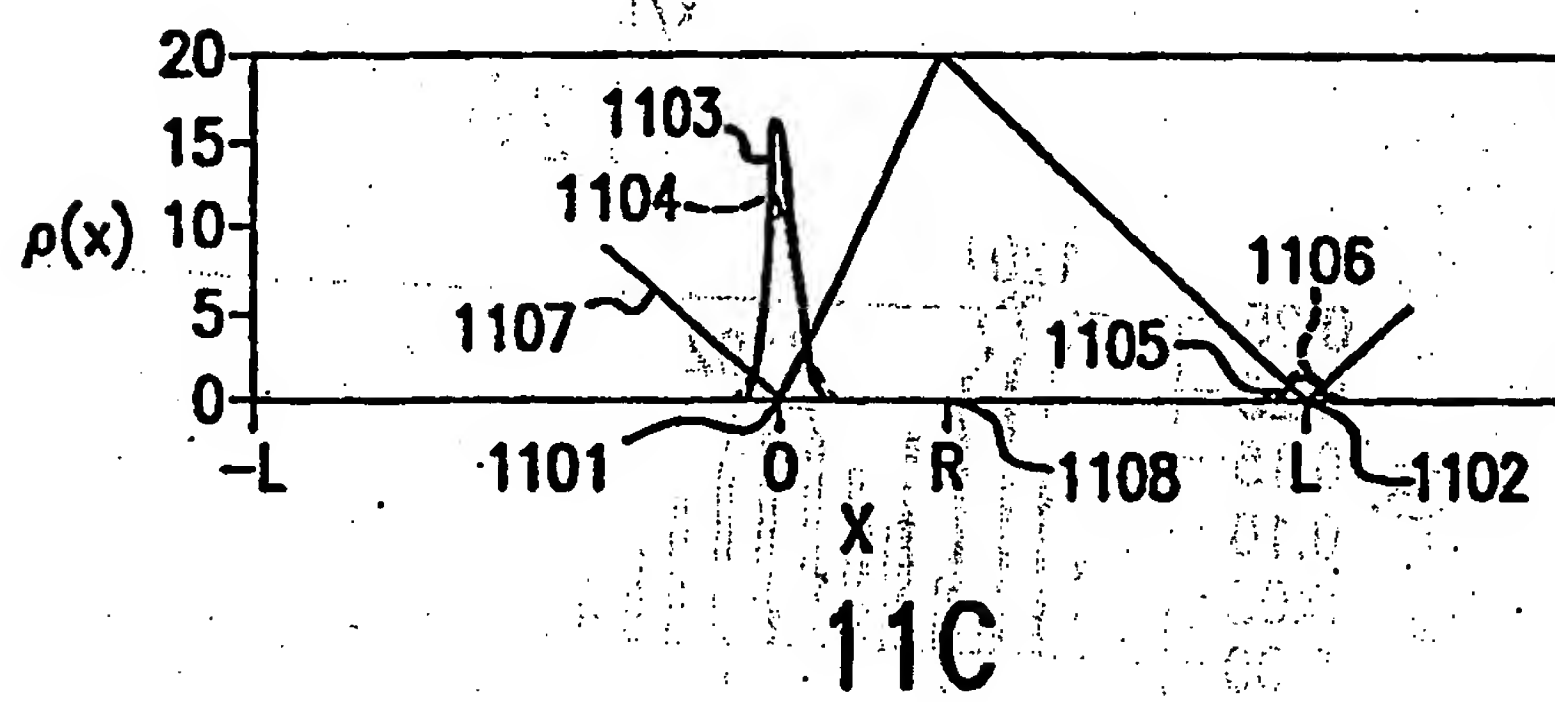
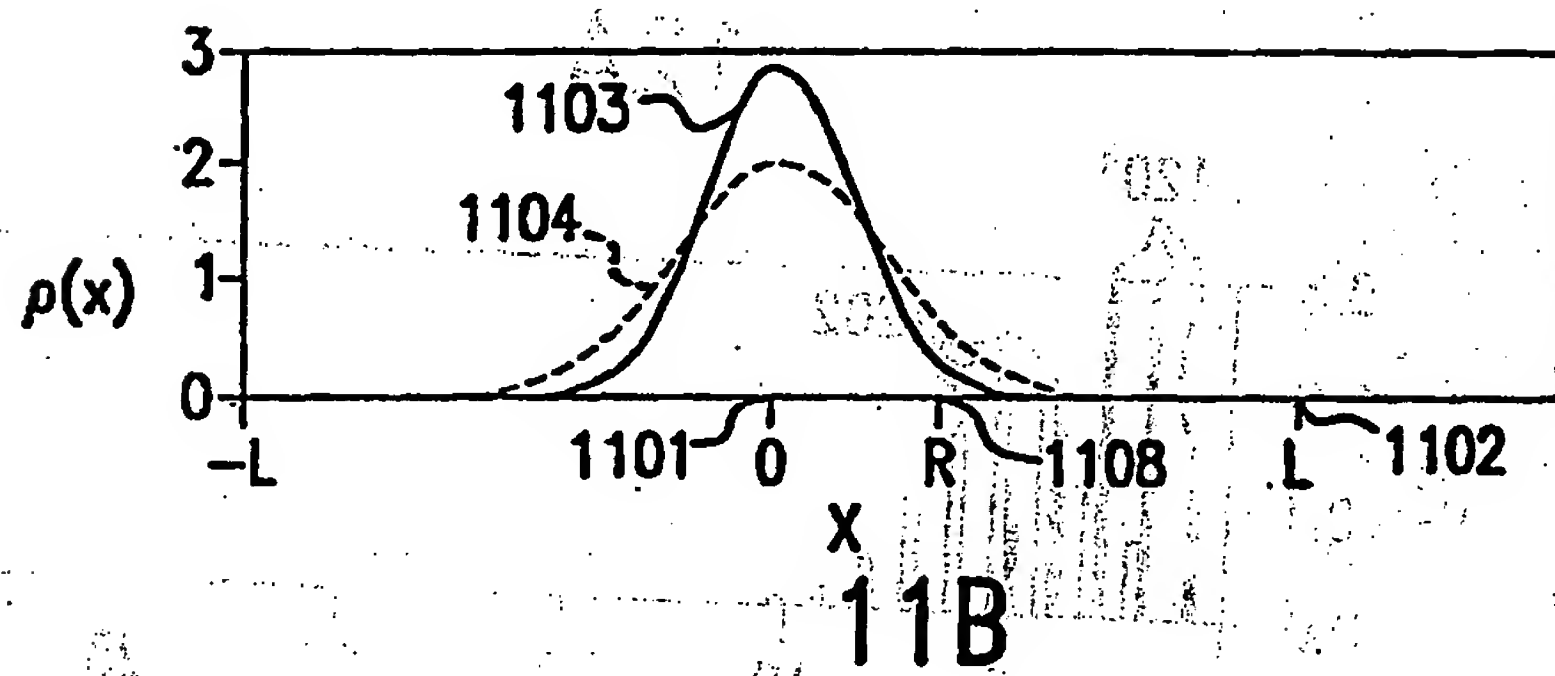
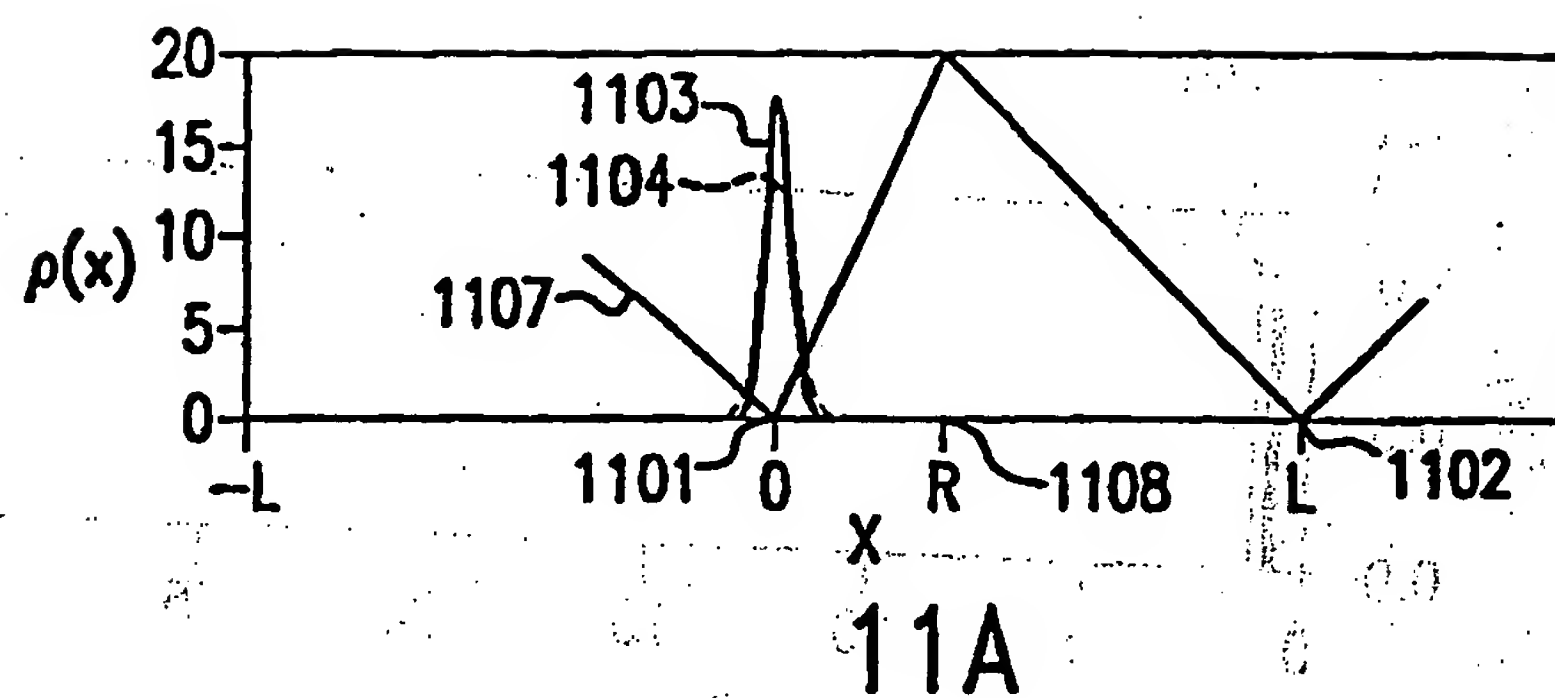
【図9】



【図10】

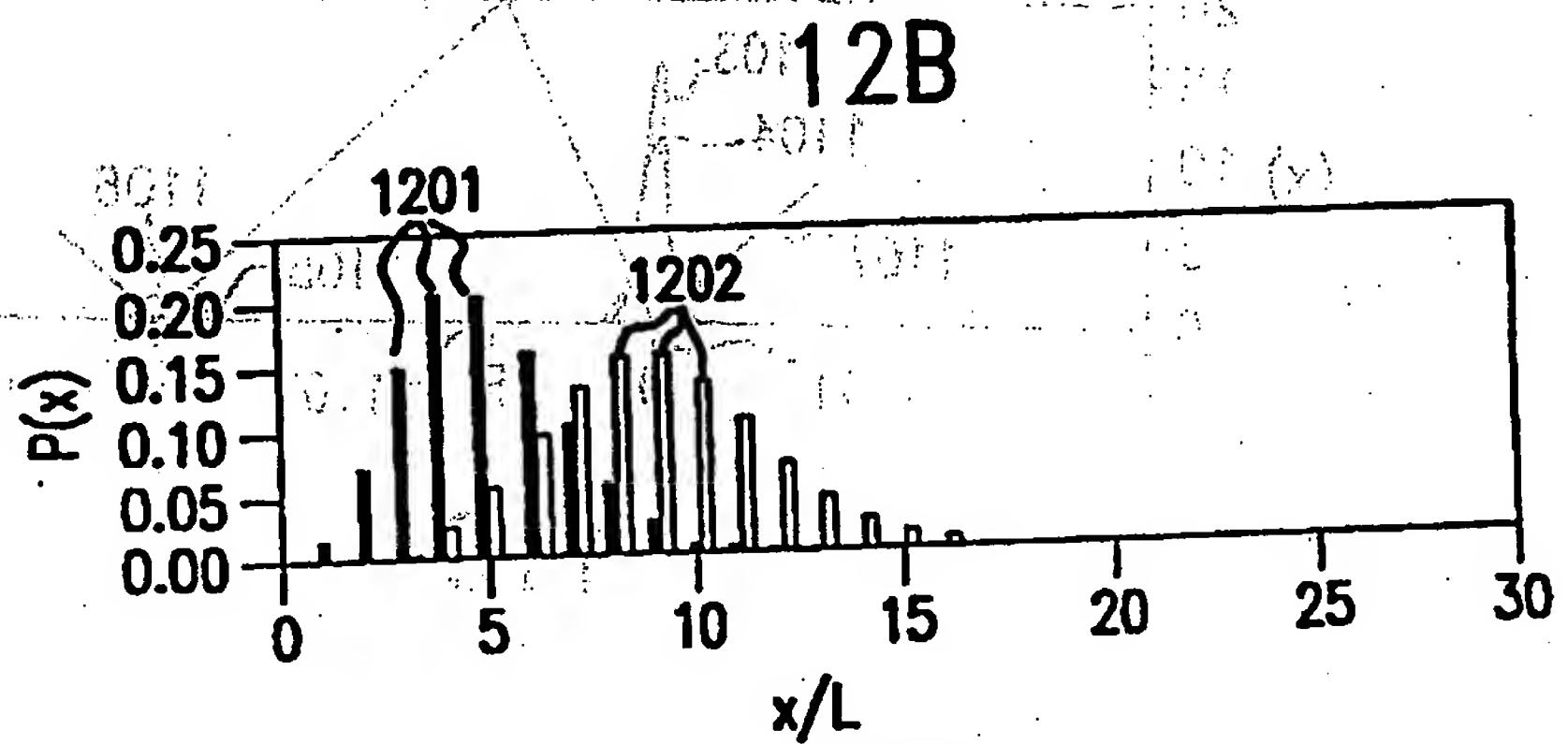
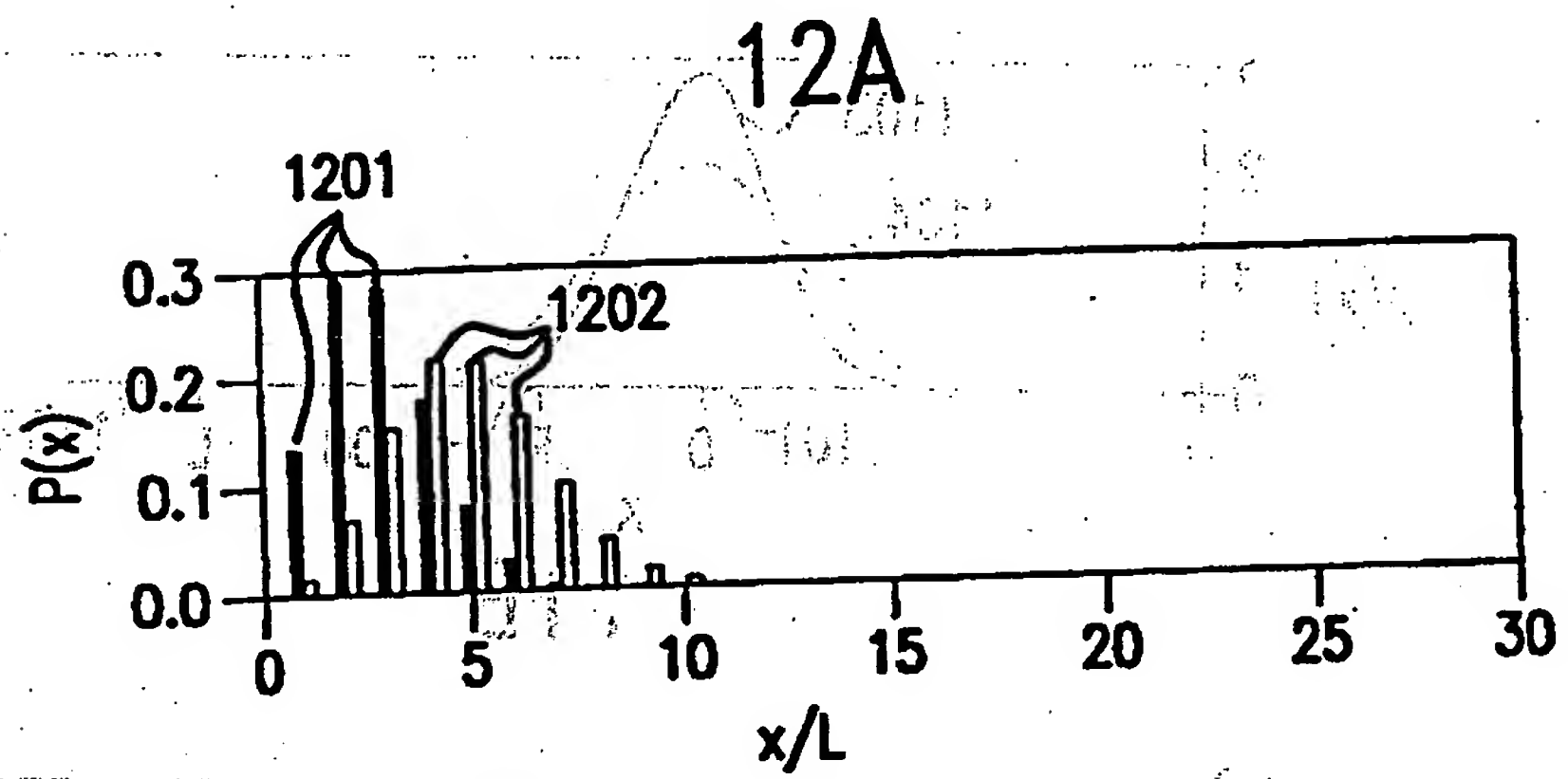
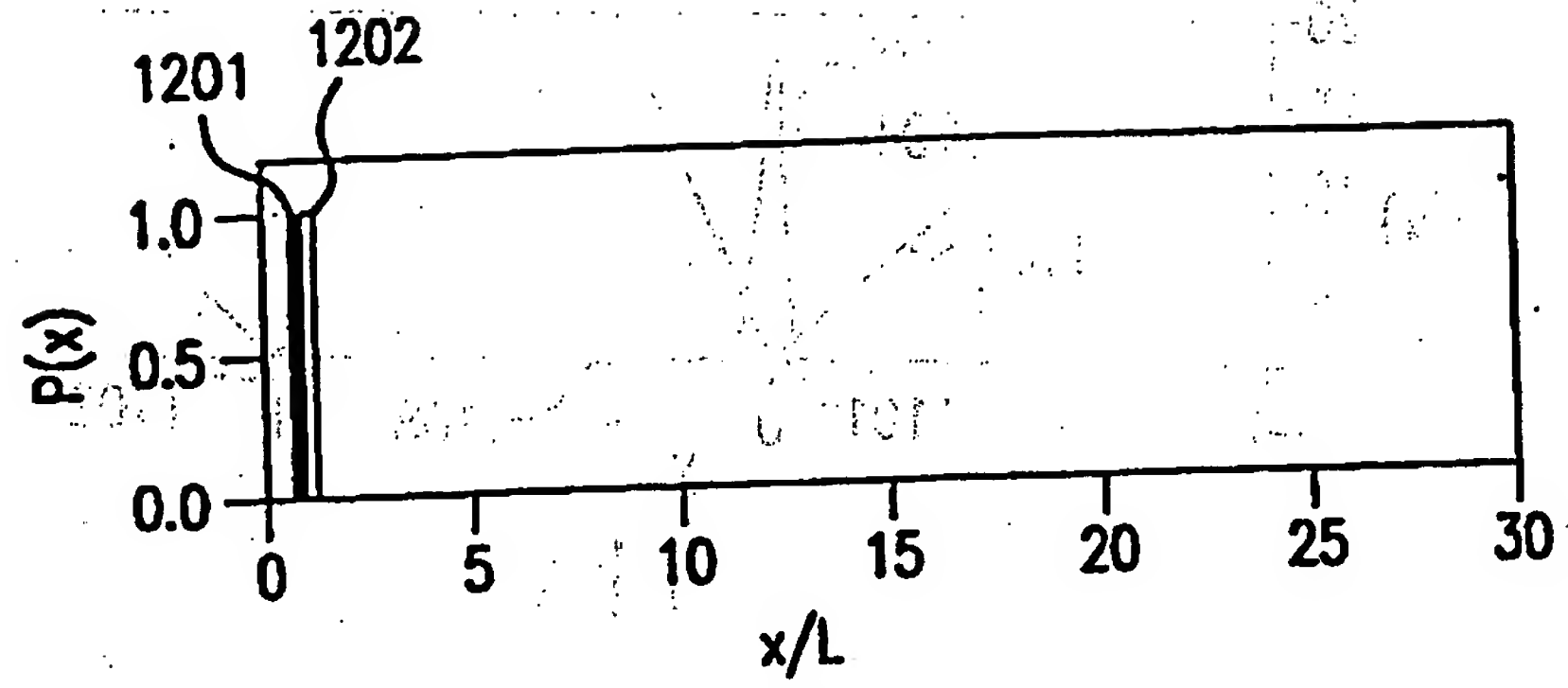


【図11】



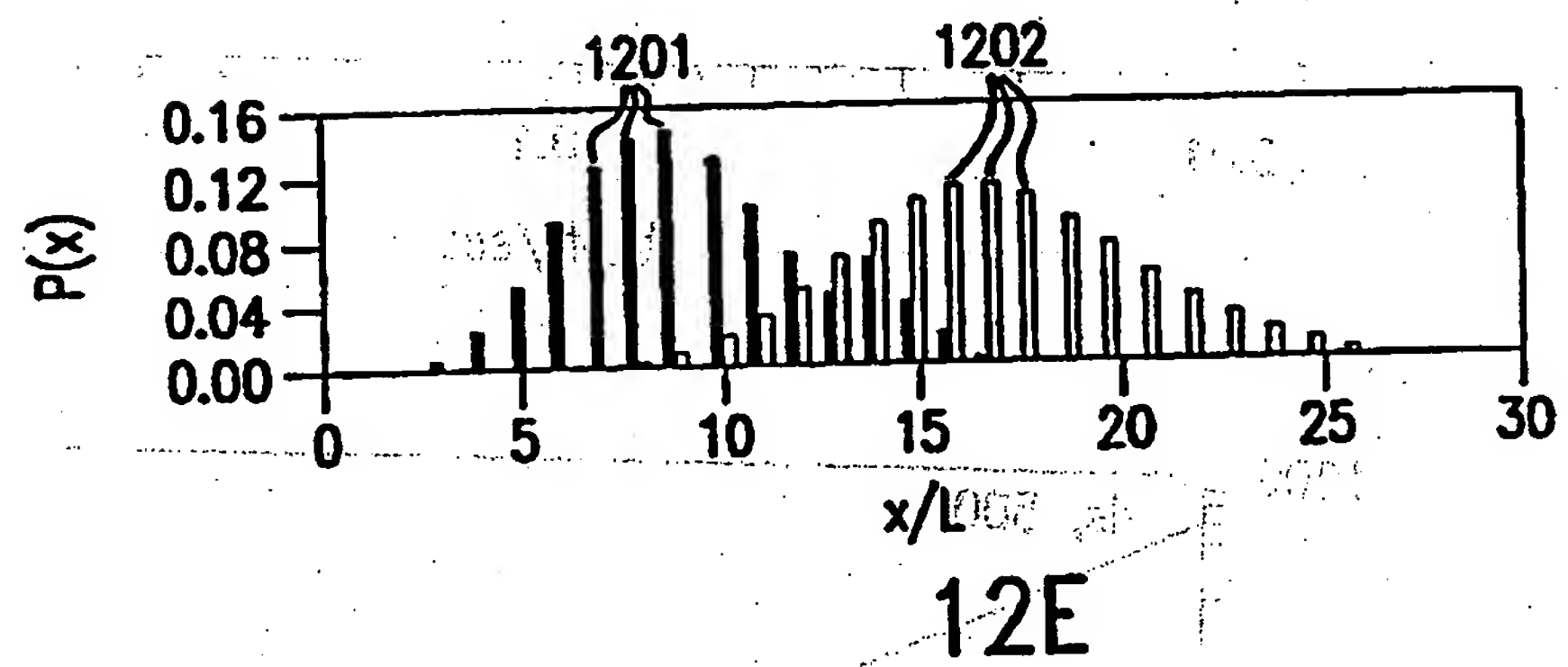
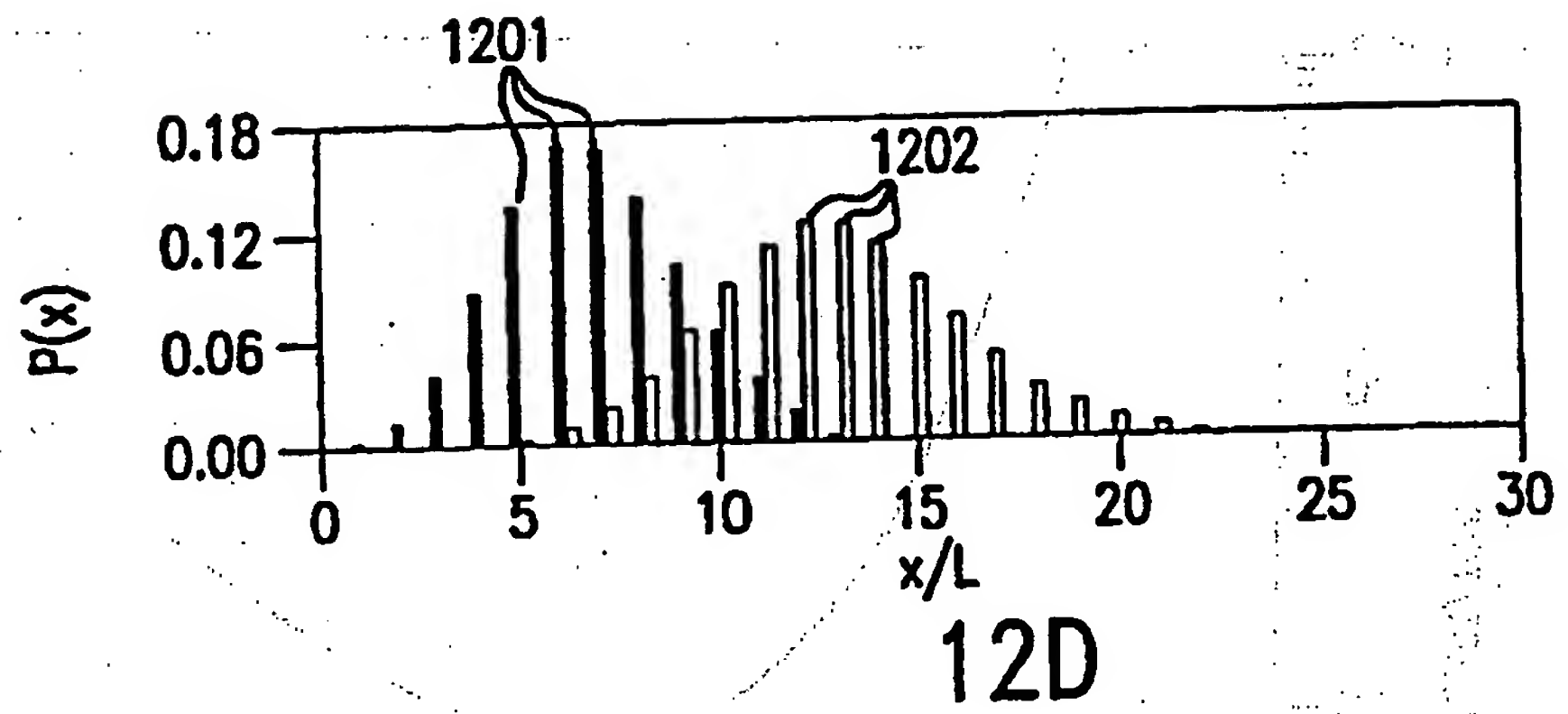


【図12A-C】

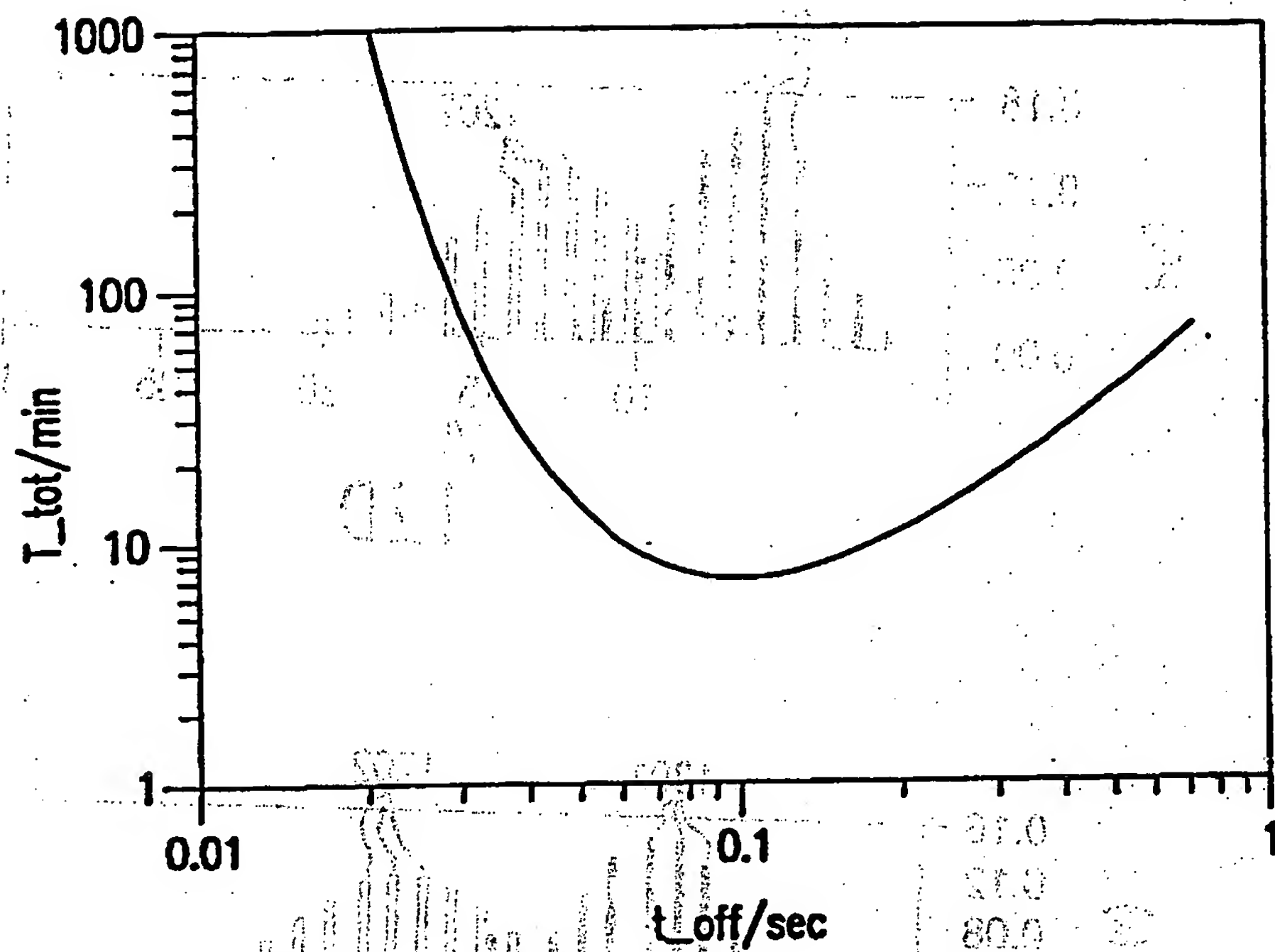


12C

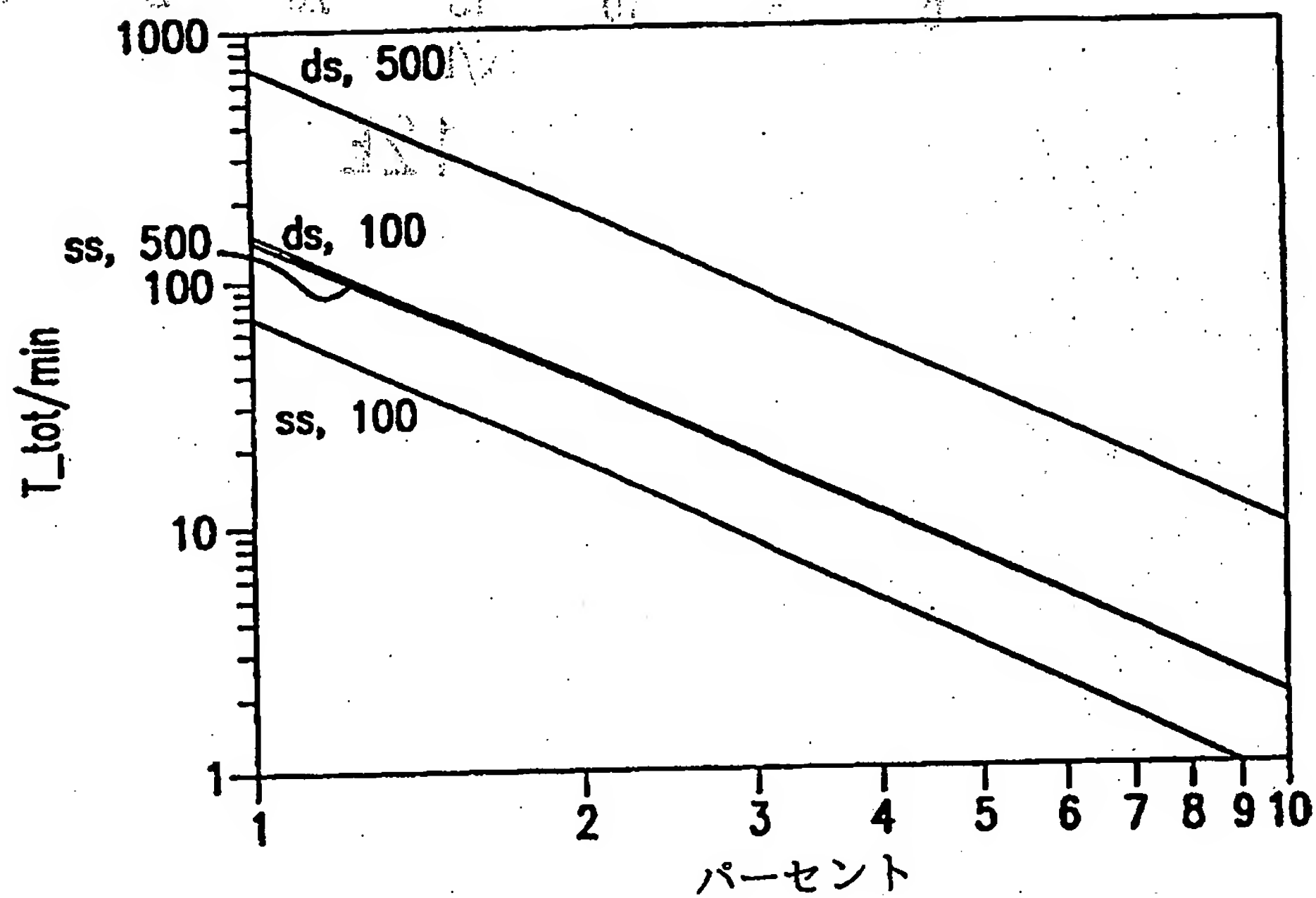
【図12D・E】



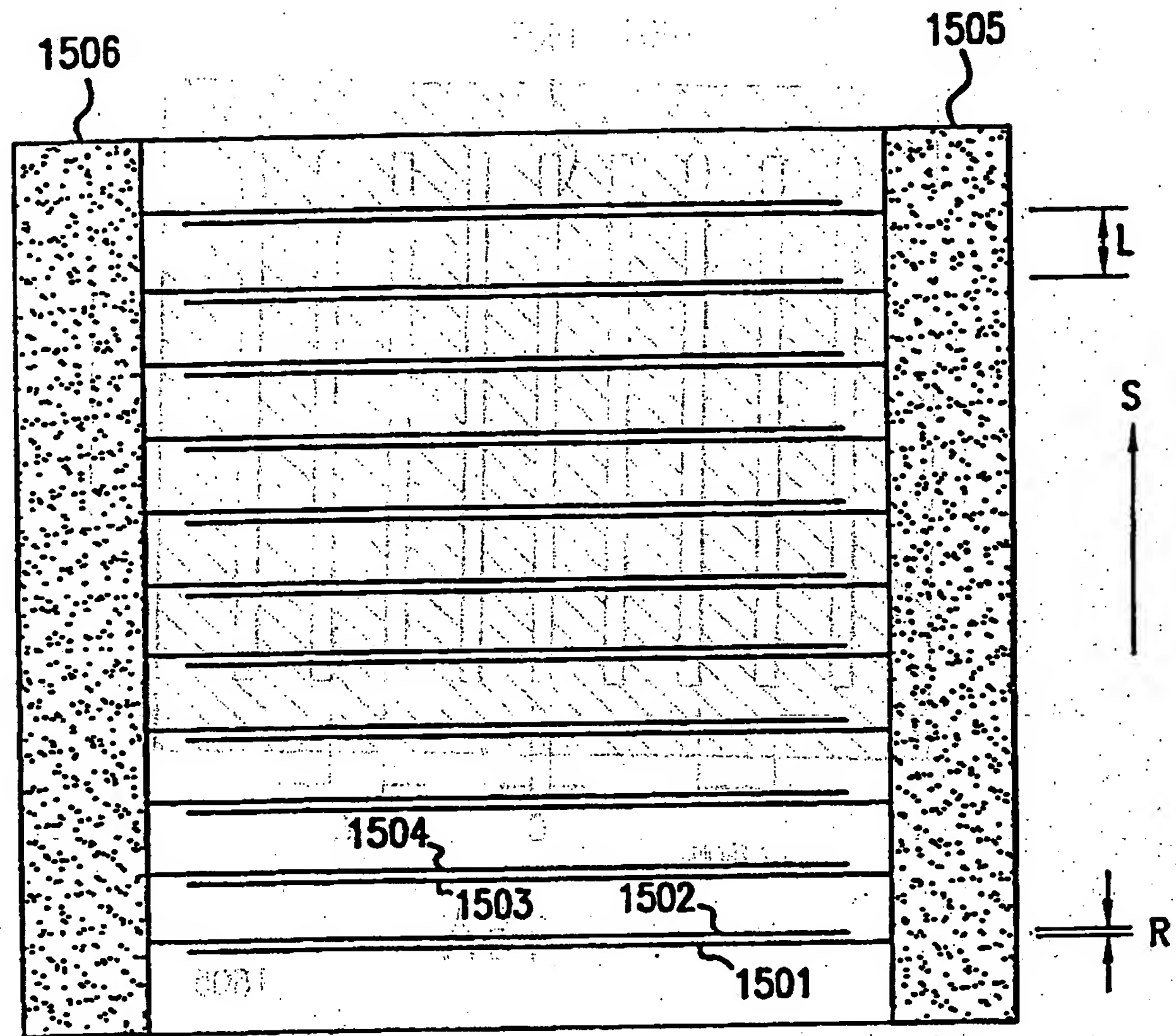
【図13】



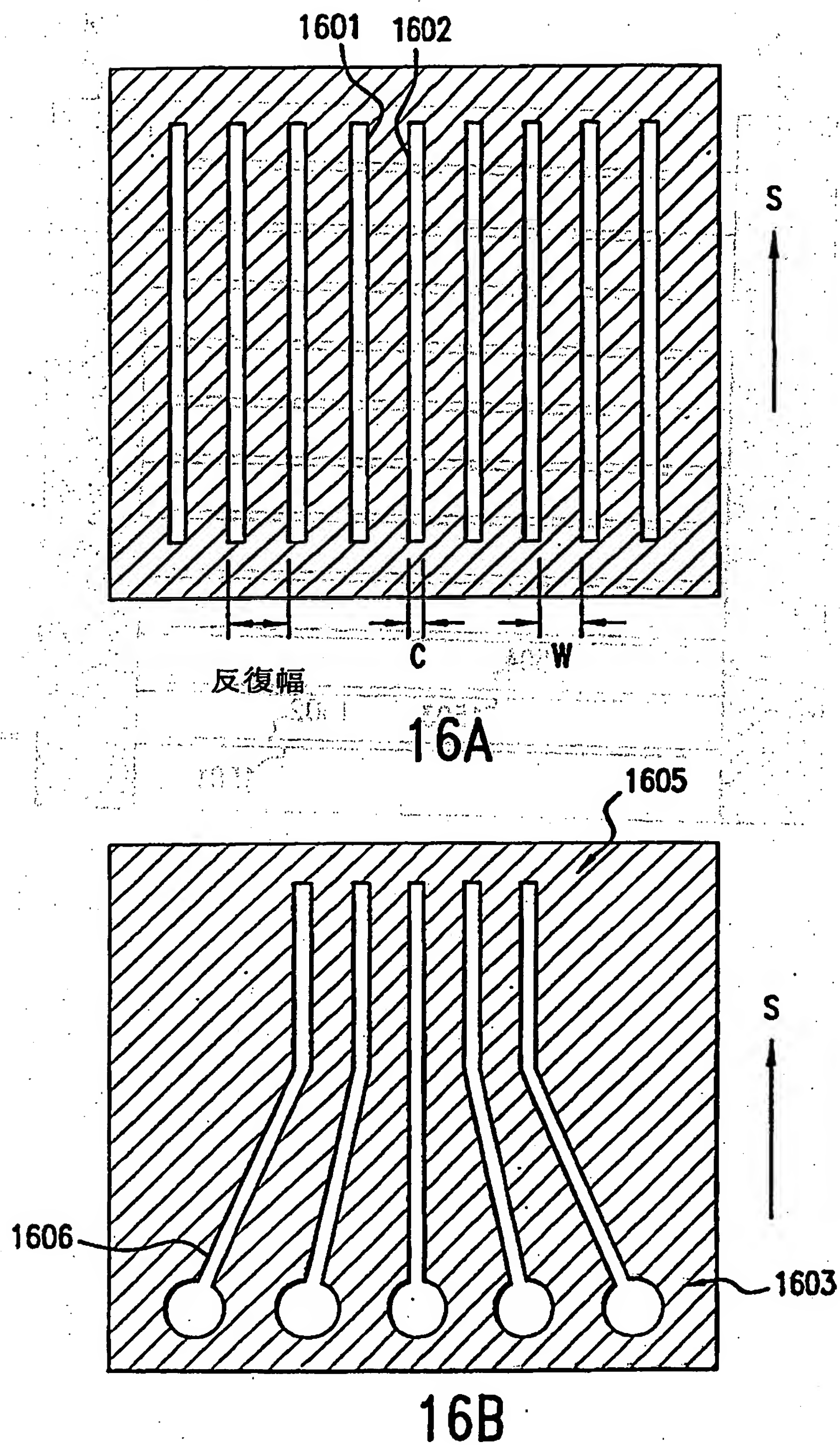
【図14】



【図15】

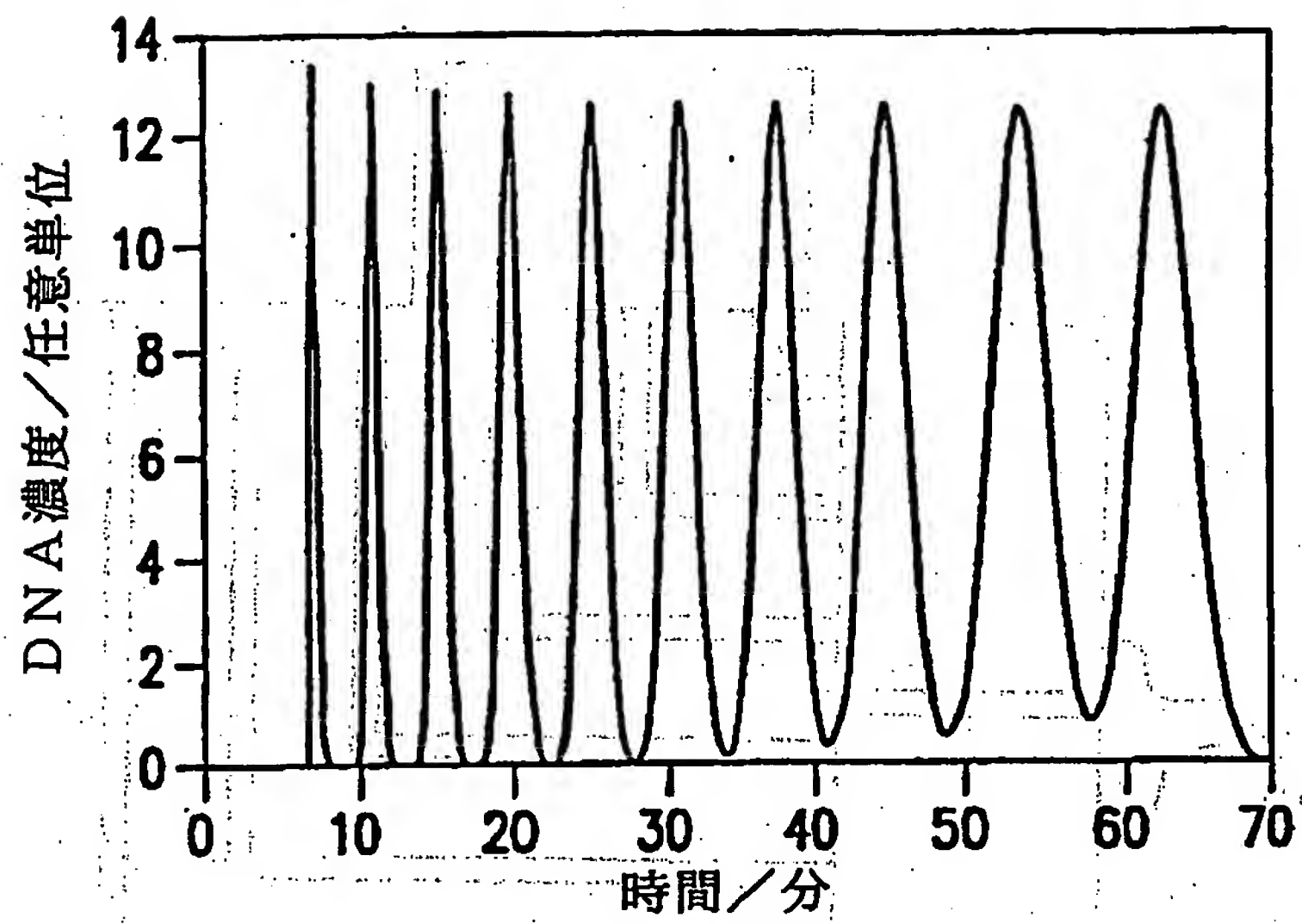


【図16】

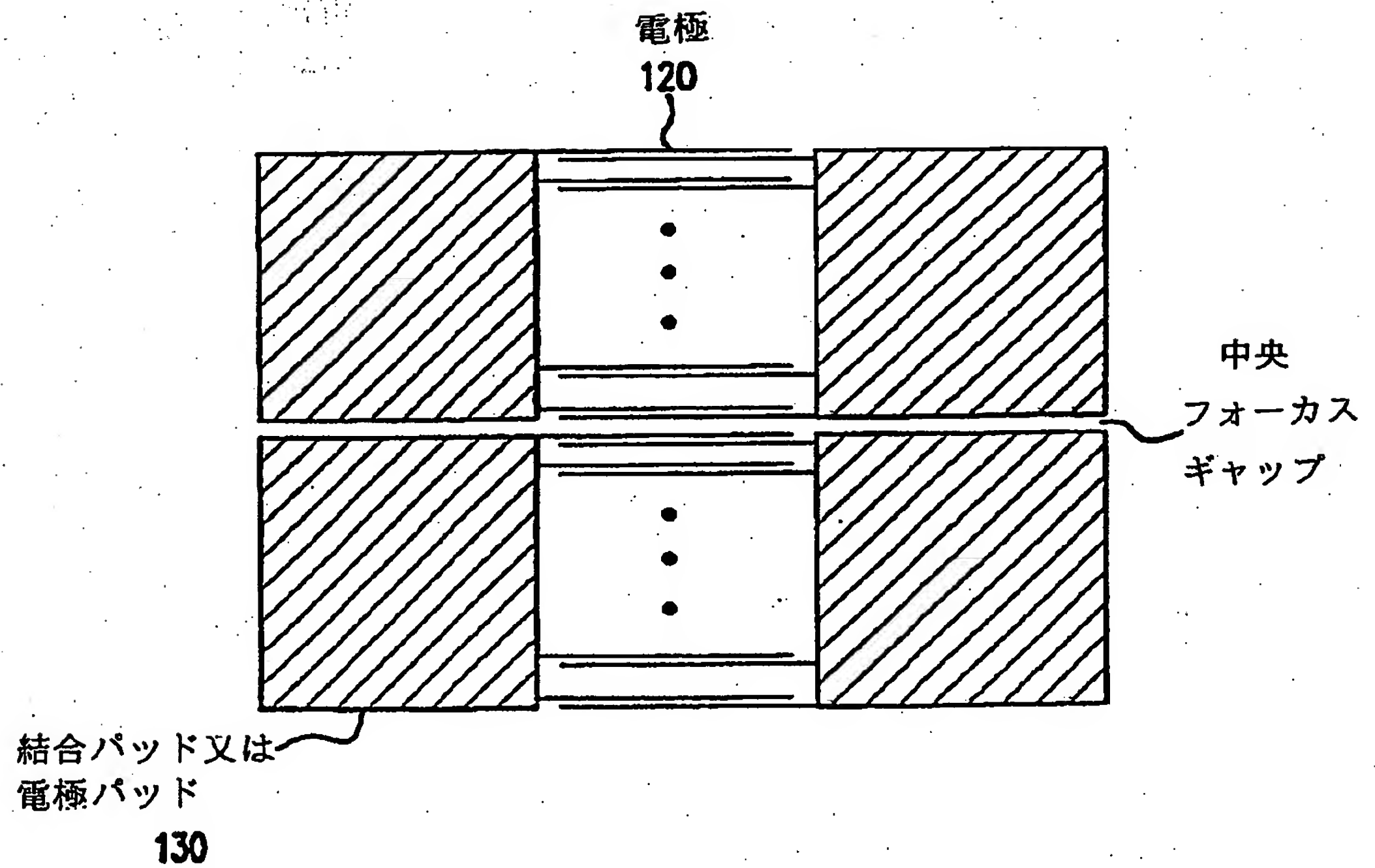




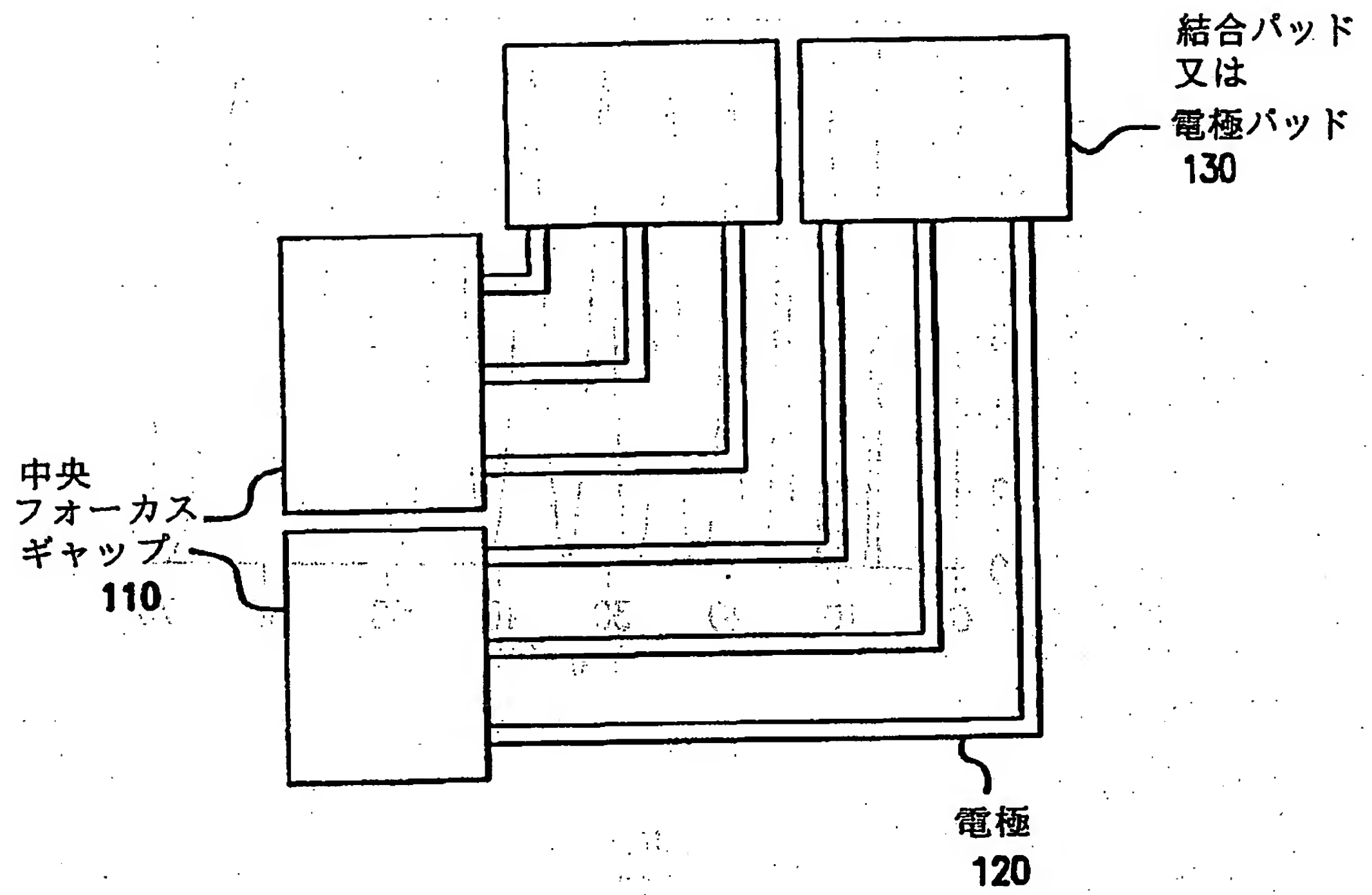
【図17】



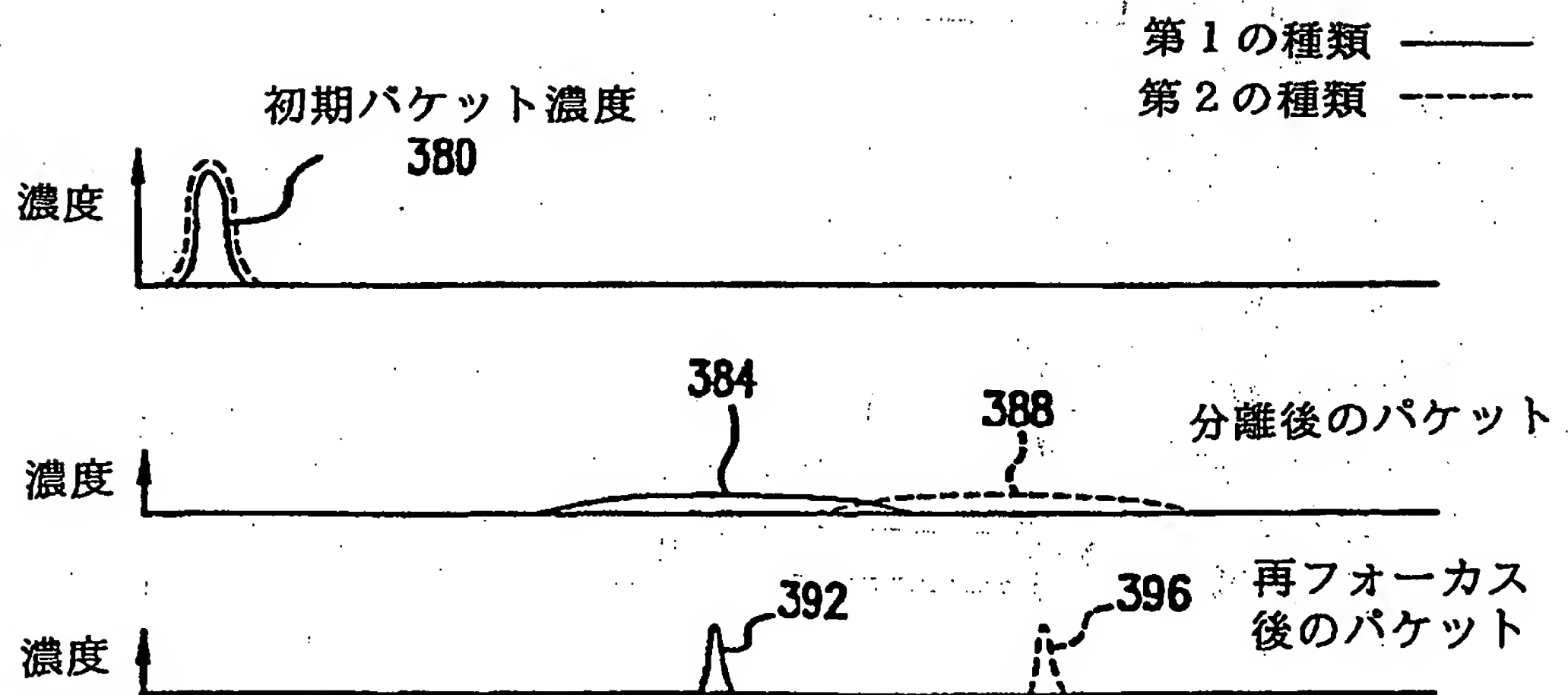
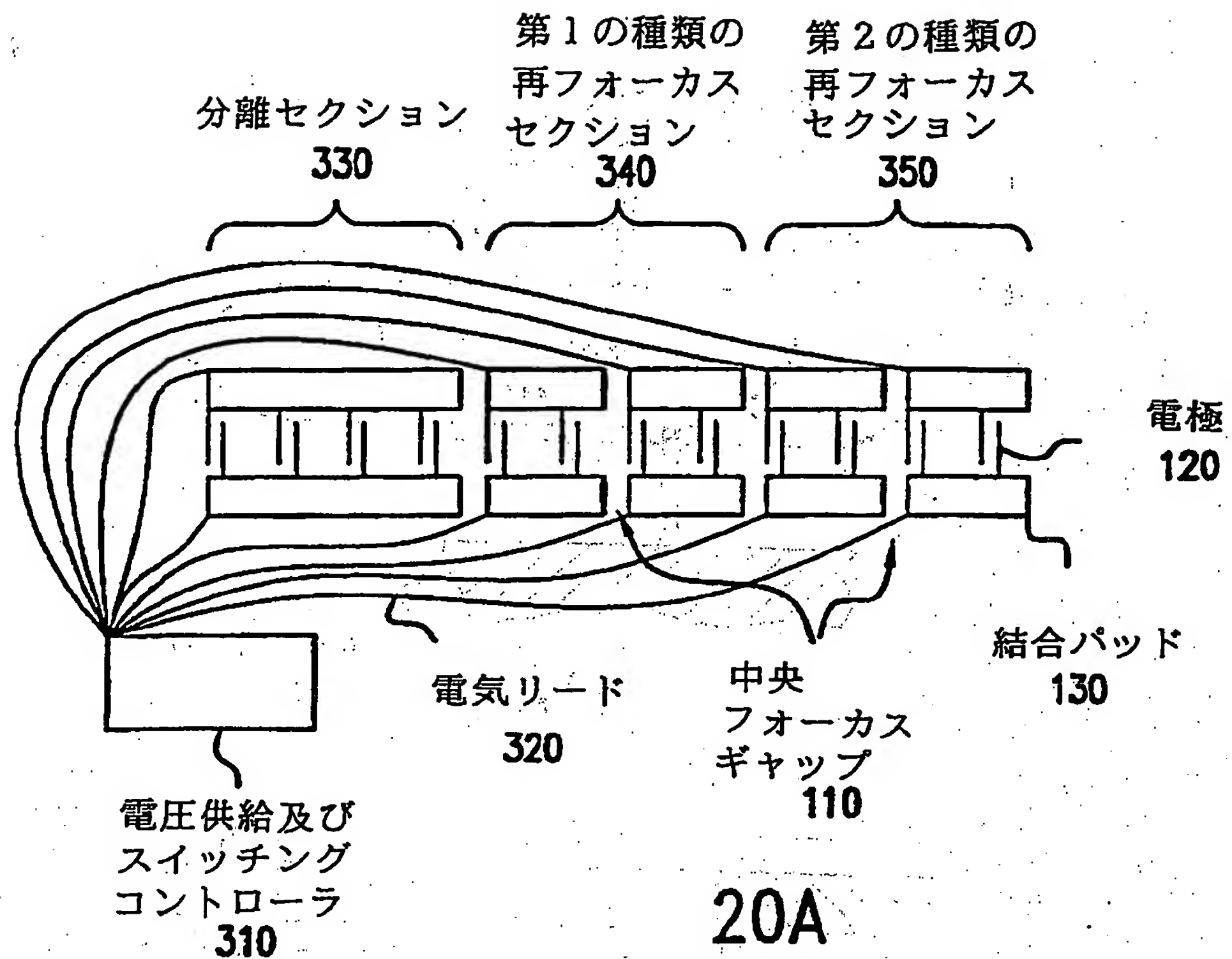
【図18】



【図19】

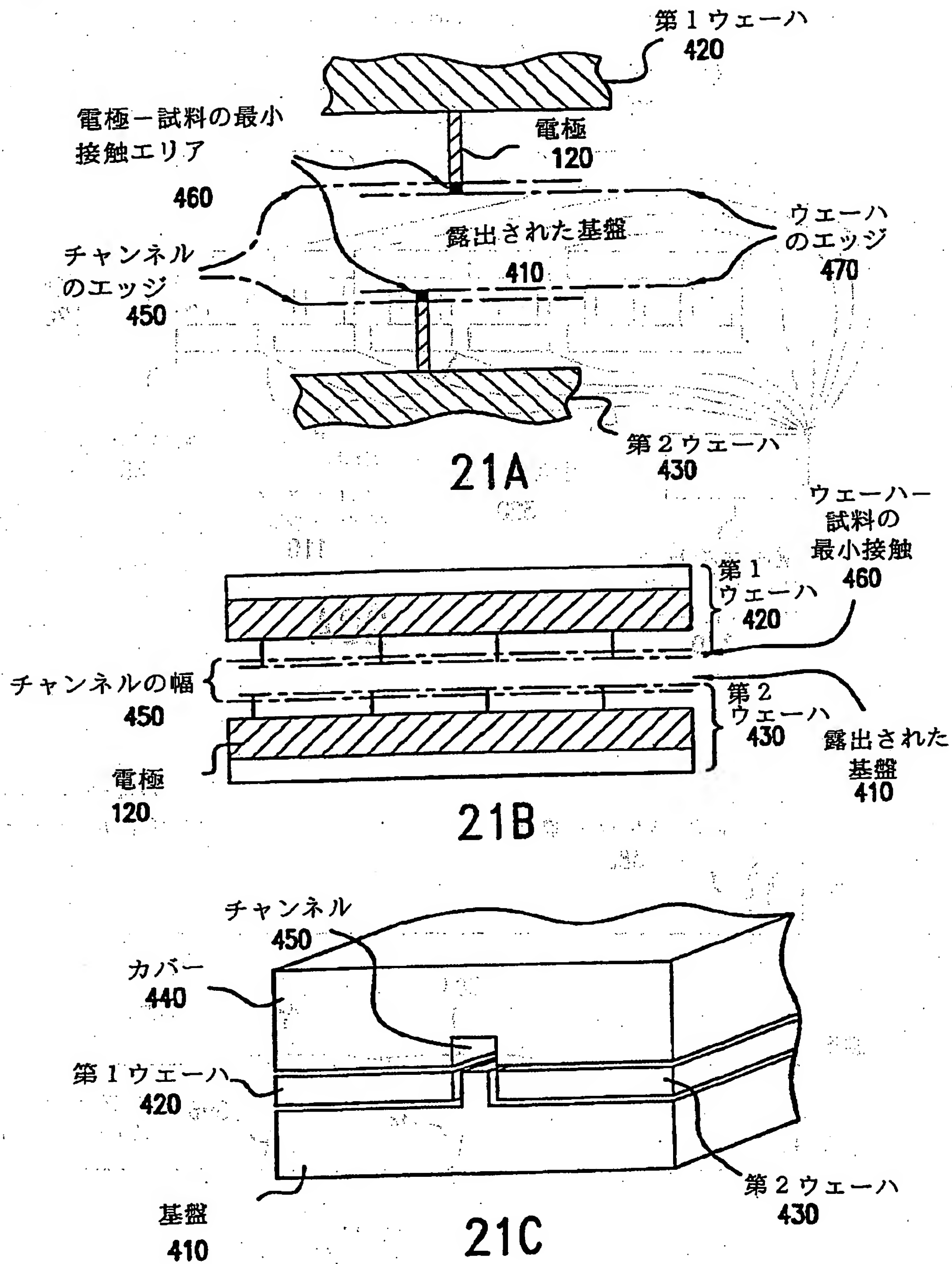


【図20】

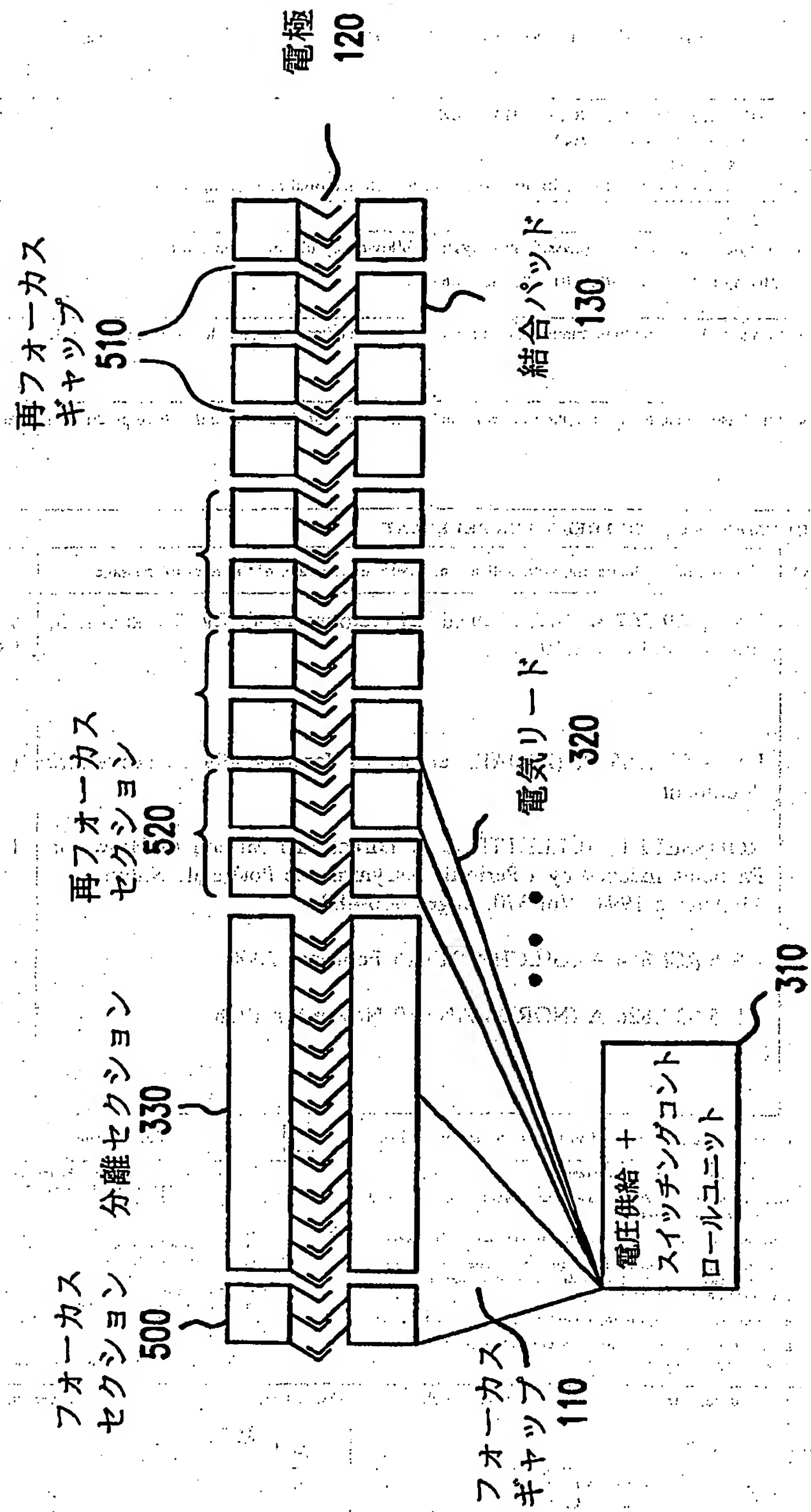


20B

【図21】

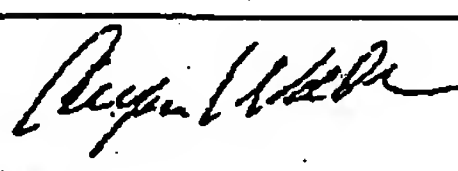


【図2.2】





## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/29195																					
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : G01N 27/26; G01N 27/447 US CL : 204/450, 600 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 204/450, 451, 547, 600, 601, 603, 660, 663 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)																							
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 5,569,367 A (BETTS et al) 29 October 1996, fig. 2 and col. 5, line 49- col.6, line19</td> <td>8,9,11,15, 18-23,25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>16,17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 5,593,565 A (AJDARI et al) 14 January 1997, see entire document</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>ROUSSELET, JULLETTE et al Directional Motion of Brownian Particles Induced by a Periodic Assymmetric Potential. Nature. 11 August 1994. Vol.370. pages 446-488</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6,224,854 A (GILCHRIST) 15 February 2000</td> <td>2-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 5,833,826 A (NORDMAN) 10 November 1998</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 5,569,367 A (BETTS et al) 29 October 1996, fig. 2 and col. 5, line 49- col.6, line19	8,9,11,15, 18-23,25	Y		16,17	X	US 5,593,565 A (AJDARI et al) 14 January 1997, see entire document	1	X	ROUSSELET, JULLETTE et al Directional Motion of Brownian Particles Induced by a Periodic Assymmetric Potential. Nature. 11 August 1994. Vol.370. pages 446-488	1	A	US 6,224,854 A (GILCHRIST) 15 February 2000	2-25	A	US 5,833,826 A (NORDMAN) 10 November 1998	3
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	US 5,569,367 A (BETTS et al) 29 October 1996, fig. 2 and col. 5, line 49- col.6, line19	8,9,11,15, 18-23,25																					
Y		16,17																					
X	US 5,593,565 A (AJDARI et al) 14 January 1997, see entire document	1																					
X	ROUSSELET, JULLETTE et al Directional Motion of Brownian Particles Induced by a Periodic Assymmetric Potential. Nature. 11 August 1994. Vol.370. pages 446-488	1																					
A	US 6,224,854 A (GILCHRIST) 15 February 2000	2-25																					
A	US 5,833,826 A (NORDMAN) 10 November 1998	3																					
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																							
<table border="0"> <tr> <td>           * Special categories of cited documents:            "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance            "E" earlier document published on or after the international filing date            "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)            "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means            "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td>           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention            "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone            "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art            "Z" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family																			
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family																						
Date of the actual completion of the international search 18 FEBRUARY 2000		Date of mailing of the international search report 07 MAR 2000																					
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JOHN S. STARSIAK JR.  Telephone No. (703) 308-0661																					

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI	テ-マコード (参考)
C12N 15/09		G01N 27/26	331Z
C12Q 1/68			301Z
			331E
		C12N 15/00	A

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ロスバーク、ジョナサン、エム。  
アメリカ合衆国 06405 コネチカット州、  
ブランフォード、コチェコ アベニュー  
45ビー

(72) 発明者 ディーム、マイケル、ダブリュ。  
アメリカ合衆国 02139 マサチューセツ  
ツ州、ケンブリッジ、ナンバー14、ハイラ  
ンド アベニュー 24

(72) 発明者 マルハーン、グレゴリー、ティー。  
アメリカ合衆国 06405 コネチカット州、  
ブランフォード、ハリソン アベニュー  
45、アパートメント ナンバー1

(72) 発明者 ウェント、グレゴリー、ティー。  
アメリカ合衆国 06443 コネチカット州、  
マディソン、スコットランド アベニュー  
25

(72) 発明者 シンプソン、ジョン  
アメリカ合衆国 06443 コネチカット州、  
マディソン、ウッドランド ロード 23、  
アパートメント ビー4

(72) 発明者 ヘンク、スティーヴン  
アメリカ合衆国 06525 コネチカット州、  
ウッドブリッジ、メーブル ヴェール ド  
ライブ 11

Fターム(参考) 2G045 DA12 DA13 FA11 FB05 FB12  
GC15  
4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 HA11  
HA19  
4B029 AA23 BB20  
4B063 QA12 QA13 QQ42 QQ52 QS12  
QS36 QS39 QX02

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**